



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Aspectos imunohematológicos dos pacientes com anemia falciforme e a influência da  
hemoglobina S na distribuição linfocitária**

**ARACAJU**

**2019**

**OSVALDO ALVES DE MENEZES NETO**

**Aspectos imunohematológicos dos pacientes com anemia falciforme e a influência da  
hemoglobina S na distribuição linfocitária**

**ARACAJU**

**2019**

**OSVALDO ALVES DE MENEZES NETO**

**Aspectos imunohematológicos dos pacientes com anemia falciforme e a influência da hemoglobina S na distribuição linfocitária**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde

**Orientadora:** Dra. Rosana Cipolotti

**ARACAJU**

**2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M543a Menezes Neto, Osvaldo Alves de  
Aspectos imunohematológicos dos pacientes com anemia  
falciforme e a influência da hemoglobina S na distribuição  
linfocitária / Osvaldo Alves de Menezes Neto ; orientadora  
Rosana Cipolotti. – Aracaju, 2019.  
72 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade  
Federal de Sergipe, 2019.

1. Anemia falciforme. 2. Anticorpos. 3. Inflamação. 4.  
Linfócitos. 5. Traço falciforme. I. Cipolotti, Rosana, orient.  
II. Título.

CDU 616.155.194

**OSVALDO ALVES DE MENEZES NETO**

**Aspectos imunohematológicos dos pacientes com anemia falciforme e a influência da hemoglobina S na distribuição linfocitária**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Orientadora: Dra Rosana Cipolotti**

---

**1º. Examinador: Dr Nivaldo Farias Vieira**

---

**2º. Examinador: Dra Simone Santana Viana**

---

**3º. Examinador: Dra Maria Aurélia da Fonseca Porto**

---

**4º. Examinador: Dra Dulce Marta Schimielguel Mascarenhas Lima**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer e reconhecer que não se faz nada sozinho no mundo é uma grande virtude. Agradeço a Deus que sempre está ao meu lado e por me guiar nas minhas escolhas. Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e sentem orgulho de tudo que eu faço. Aos meus irmãos e sobrinho por todo amor, carinho e união. Valeu Rodrigo por caminhar junto e me guiar no doutorado. Parabéns para você também. Minha gratidão especial à Dra. Rosana Cipolotti, minha orientadora. Obrigado por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho que se iniciaram nos últimos anos de graduação. Obrigado. À Dra. Simone Viana, amiga e companheira de trabalho. A Dra Priscila Percout pela amizade e cooperação. A hematologia nos uniu. Aos alunos que participaram junto comigo na pesquisa. Obrigado pela ajuda na coleta de dados. Aos pacientes e seus pais que sempre me recebem com um sorriso e colaboraram com a realização desse trabalho que foi para vocês. Obrigado pela confiança. Aos funcionários do ambulatório de Hospital Universitário que sempre me receberam com paciência e atenção, mesmo quando eu dava trabalho e atrapalhava. Aos meus amigos de turma do doutorado pelo companheirismo e torcida.

**MUITO OBRIGADO!!!!**

## RESUMO

**Introdução:** A anemia falciforme (AF) é uma doença genética responsável pela produção da hemoglobina S (HbS) e possui uma grande variedade de apresentações clínicas. Uma das terapêuticas mais difundidas é a transfusão, que embora ofereça benefício clínico, não é isenta de complicações, a exemplo da aloimunização. A inflamação crônica compõe a fisiopatologia da doença falciforme e pode ser fator adicional para a aloimunização. O traço falciforme (TF) é considerado condição benigna e assintomática, contudo algumas complicações clínicas já foram descritas nesses pacientes. Os objetivos deste estudo foram: identificar a proporção de aloimunização, do perfil de antígenos eritrocitários e fatores relacionados, avaliar a relação entre aloimunização e o diagnóstico por triagem neonatal nos pacientes com AF, e avaliar a distribuição linfocitária dos pacientes com AF e TF. **Métodos:** Foram revisados os prontuários dos pacientes portadores de AF acompanhados em um serviço ambulatorial especializado vinculado a um Hospital Universitário, com a finalidade de obter-se dados clínicos, laboratoriais e o resultado da triagem neonatal. Os dados transfusionais e exames pré-transfusionais foram obtidos no hemocentro local. Em um corte amostral foram incluídos pacientes portadores de AF, TF e indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatias para realização de imunofenotipagem de sangue periférico com avaliação de linfócitos B, linfócitos T (CD4 e CD8) e células NK. **Resultados:** A amostra foi composta por 270 pacientes com taxa transfusional de 66,5% e de aloimunização de 19,6%. Os pacientes foram negativos para a maioria dos antígenos de alta imunogenicidade do sistema Rh/Kell. Foram identificados 11 tipos de anticorpos, sendo mais prevalentes o anti-E, anti-e, anti-C, anti-JKa, anti-Fya e anti-Kell. A presença de autoanticorpos foi maior nos pacientes aloimunizados em comparação com os pacientes não aloimunizados. A aloimunização foi relacionada com a maior média de idade, maior frequência de uso de hidroxycarbamida, maior número de transfusões e valores maiores de Volume Corpuscular Médio (VCM). A taxa de aloimunização entre os pacientes diagnosticados pela triagem neonatal (TN) foi semelhante à dos pacientes com o diagnóstico mais tardio ( $p=0,04$ ). Os pacientes com AF apresentaram valores menores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e maiores de células NK total, CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>. Os portadores de TF apresentaram valores aumentados de células NK total e CD56<sup>bright</sup>. **Conclusões:** A proporção de pacientes aloimunizados encontrada foi de 19,6%, e relacionada com a maior média de idade, maior frequência de uso de hidroxycarbamida e maior taxa de autoanticorpos. Os aloanticorpos mais frequentes foram os do sistema Rh/Kell. A TN não se mostrou protetora para a aloimunização. Existem diferenças na distribuição de linfócitos relacionadas a presença de HbS e sugere que alterações no estado inflamatório ocorrem em pacientes assintomáticos portadores de TF.

**Descritores:** Anemia falciforme. Anticorpos. Inflamação. Linfócitos. Traço falciforme.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease responsible for the production of hemoglobin S (HbS) and has a wide variety of clinical presentations. One of the most widespread therapies is transfusion, which, while offering clinical benefit, is not free from complications such as alloimmunization. Chronic inflammation composes the pathophysiology of sickle cell disease and may be an additional factor for alloimmunization. Sickle cell trait (SCT) is considered a benign and asymptomatic condition, however some clinical complications have been described in these patients. The objectives of this study were: to identify the proportion of alloimmunization, erythrocyte antigen profile and related factors, to evaluate the relationship between alloimmunization and diagnosis by neonatal screening (NS) in patients with SCA, and to evaluate the lymphocyte distribution of patients with SCA and SCT. **Methods:** We reviewed the medical records of patients with SCA followed up at a specialized outpatient clinic linked to a University Hospital, in order to obtain clinical, laboratory and neonatal screening results. Transfusion data and pre-transfusion tests were obtained at the local hemocenter. Patients with SCA, SCT and individuals without any hemoglobinopathies were included in a sample cut for peripheral blood immunophenotyping with evaluation of B lymphocytes, T lymphocytes (CD4 and CD8) and NK cells. **Results:** The sample consisted of 270 patients with a transfusion rate of 66.5% and alloimmunization of 19.6%. Patients were negative for highly immunogenic antigens of the Rh / Kell system. Eleven types of antibodies were identified, with anti-E, anti-e, anti-C, anti-JKa, anti-Fya and anti-Kell being more prevalent. The presence of autoantibodies was higher in alloimmunized patients compared to non-alloimmunized patients. Alloimmunization was related to higher mean age, higher frequency of hydroxycarbamide use, greater number of transfusions, and higher values of Mean Corpuscular Volume (MCV). The alloimmunization rate among patients diagnosed by NS was similar to that of patients with the later diagnosis ( $p = 0.08$ ). Patients with SCA had lower values of CD4 + T lymphocytes and larger total NK cells, CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup>. SCT patients presented increased total and CD56<sup>bright</sup> NK cells. **Conclusions:** The proportion of alloimmunized patients found was 19.6%, related to the higher mean age, higher frequency of hydroxycarbamide use and higher rate of autoantibodies. The most frequent alloantibodies were those of the Rh / Kell system. NS was not protective for alloimmunization. There are differences in the distribution of lymphocytes related to the presence of HbS and suggest that changes in the inflammatory state occur in asymptomatic patients with SCT.

**Descriptores:** Sickle cell anemia. Antibodies. Inflammation. Lymphocytes. Sickle cell trait.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da hemoglobina A .....	18
Figura 2 – Prevalência dos portadores de traço falciforme em alguns estados do Brasil .....	22
Figura 3 – Eritrócitos normais e falciformes, e vasocclusão .....	24
Figura 4 – Fisiopatologia da anemia falciforme (inflamação) .....	27
Figura 5 – Histograma com estratégia de análise de linfócitos B e T(CD4+/CD8+) .....	40
Figura 6 – Histograma com estratégia de análise dos subtipos de células NK .....	41
Figura 7 – Desenho da coorte .....	43
Figura 8 – Frequências (número) dos anticorpos irregulares .....	44
Figura 9 – Porcentagens de linfócitos B e T CD3+ nos grupos AA, AS e SS .....	46
Figura 10 – Porcentagens de linfócitos T (CD4+/CD8+) nos grupos AA, AS e SS .....	47
Figura 11 – Porcentagens de linfócitos NK nos grupos AA, AS e SS .....	47
Figura 12 – Porcentagem de células NK CD56 <sup>bright</sup> e CD56 <sup>dim</sup> nos grupos AA, AS e SS .....	48
Figura 13 – Submissão artigo 1 .....	71
Figura 14 – Submissão artigo 2 .....	72

## **LISTAS DE TABELAS**

Tabela 1 – Frequência de antígenos eritrocitários nos pacientes com anemia falciforme.....	44
Tabela 2 – Comparação entre as variáveis epidemiológicas e clínicas e a aloimunização ....	45
Tabela 3 – Comparação entre a variáveis laboratoriais e clínicas e a aloimunização .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	Homozigoto sem hemoglobinopatias
<b>AF</b>	Anemia falciforme
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AS</b>	Heterozigoto AS – traço falciforme
<b>AST</b>	Asparato aminotransferase
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>AVE</b>	Acidente vascular encefálico
<b>BI</b>	Bilirrubina indireta
<b>BT</b>	Bilirrubina total
<b>CAAE</b>	Certificado de apresentação para apreciação ética
<b>CD</b>	Grupamento de diferenciação
<b>DAMP’S</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DF</b>	Doença falciforme
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbSC</b>	Hemoglobinopatia SC
<b>HbS</b>	Hemoglobina S
<b>HEMOSE</b>	Hemocentro de Sergipe
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigen /Antígenos Leucocitários Humanos
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HVE</b>	Hipertrofia Ventricular Esquerda
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IR</b>	Isquemia/reperfusão
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NKT</b>	Células T Natural Killer
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PAI</b>	Pesquisa de anticorpos irregulares
<b>PAMP’s</b>	Padrões moleculares associados ao patógeno
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato-salina
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase

<b>PNTN</b>	Programa De Triagem Nacional Neonatal
<b>SS</b>	Homozigoto SS
<b>STA</b>	Síndrome Torácica Aguda
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TF</b>	Traço falciforme
<b>TN</b>	Triagem neonatal
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UFS</b>	Universidade Federal de Sergipe
<b>Val</b>	Valina
<b>VCM</b>	Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 <b>Introdução.....</b>	<b>17</b>
2.2 <b>Hemoglobinopatias.....</b>	<b>19</b>
2.3 <b>Síndromes falciformes .....</b>	<b>20</b>
2.4 <b>Evolução do conhecimento científico da Hb S.....</b>	<b>20</b>
2.5 <b>Epidemiologia .....</b>	<b>22</b>
2.6 <b>Fisiopatologia.....</b>	<b>24</b>
2.7 <b>Diagnóstico.....</b>	<b>28</b>
2.8 <b>Quadro clínico .....</b>	<b>29</b>
2.9 <b>Traço falciforme: um espectro da doença falciforme? .....</b>	<b>30</b>
2.9.1 <b>Repercussões clínicas.....</b>	<b>30</b>
2.10 <b>Tratamento .....</b>	<b>31</b>
2.10.1 <b>Hidroxiureia (Hidroxycarbamida).....</b>	<b>31</b>
2.10.2 <b>Transplante de medula óssea.....</b>	<b>32</b>
2.10.3 <b>Novas terapêuticas .....</b>	<b>32</b>
2.10.4 <b>Terapia transfusional.....</b>	<b>33</b>
2.10.4.1 <b><i>Aloimunização pós-transfusional.....</i></b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>365</b>
3.1 <b>Geral:.....</b>	<b>365</b>
3.2 <b>Específicos: .....</b>	<b>365</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>376</b>
4.1 <b>Parte 1 .....</b>	<b>376</b>
4.1.1 <b>Exames laboratoriais .....</b>	<b>36</b>
4.1.2 <b>Ecocardiograma.....</b>	<b>376</b>
4.1.3 <b>Doppler transcraniano .....</b>	<b>387</b>
4.1.4 <b>Avaliação transfusional .....</b>	<b>37</b>
4.1.5 <b>Análise dos dados.....</b>	<b>398</b>
4.2 <b>Parte 2 .....</b>	<b>398</b>
4.2.1 <b>Análise dos dados.....</b>	<b>420</b>
4.3 <b>Considerações éticas.....</b>	<b>432</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>443</b>
5.1	Parte 1	443
5.2	Parte 2	476
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
6.1	Parte 1	49
6.2	Parte 2	532
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>554</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>565</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>576</b>
	<b>APÊNDICE A – Termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE)</b>	<b>654</b>
A.1	TCLE (parte 1)	654
A.2	TCLE (parte 2)	677
	<b>APÊNDICE B – Questionário</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE C – Artigos</b>	<b>711</b>
C.1	Artigo 1 (artigo original - Revista Transfusion)	711
C.2	Artigo 2 (Brief Reports - British Journal of Haematology)	722

## 1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma desordem genética que acarreta a polimerização da hemoglobina e repercute clinicamente com hemólise, vaso-occlusão e inflamação. (ZAGO; PINTO, 2007). As hemácias anormais apresentam alterações estruturais na membrana que, além de obstruírem a microcirculação, provocam lesão endotelial com inflamação, liberação de interleucinas e expressão de moléculas de adesão. (PLATT, 2000).

O uso de hidroxycarbamida foi um importante avanço no cuidado de pacientes com AF. (AZAR; WONG, 2017). Não obstante, as transfusões de hemácias permanecem desempenhando papel relevante no tratamento desses pacientes. Metade dos portadores de AF recebem concentrado de hemácias em algum estágio da vida, e de 5% a 10% entram em programa de transfusão crônica. (MCGANN; NERO; WARE, 2017; ROBERTS et al., 2012).

Repetidas exposições às hemácias transfundidas tornam esses pacientes mais susceptíveis a complicações decorrentes das hemotransfusões (YEE et al., 2018) dentre as quais a aloimunização. (YAZDANBAKHS; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012). A sua ocorrência está relacionada ao aumento da prevalência de dor crônica e à redução da sobrevida quando comparadas com pacientes não aloimunizados. (TELEN et al., 2015). Outro fator agravante é que a aloimunização eritrocitária limita a disponibilidade de concentrados de hemácias para futuras hemotransfusões. (LASALLE-WILLIAMS et al., 2011).

Para evitar a aloimunização deve ser realizada a fenotipagem eritrocitária dos pacientes e doadores, e as hemácias transfundidas devem ser fenótipo idênticas. Os pacientes com AF devem ser submetidos à fenotipagem eritrocitária estendida antes do início da terapêutica transfusional, e as hemácias transfundidas devem ser compatíveis para os sistemas ABO, Rh (antígenos C, c, D, E, e) e Kell. Para pacientes aloimunizados e aqueles em esquema transfusional crônico é recomendável que a fenotipagem seja estendida para os diversos sistemas eritrocitários. (PINTO; BRAGA; SANTOS, 2011; ROBERTS et al., 2012; VICHINSKY, 2012a;).

A elevada morbimortalidade e os custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) do tratamento das complicações decorrentes da AF levaram à implantação de programas de triagem neonatal (TN) para diagnóstico precoce, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2016) permitindo melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes com AF. (MORAES; GALIOTI, 2010). No estado de Sergipe - região nordeste do Brasil a TN universal para hemoglobinopatias foi iniciada em outubro de 2011 e é realizada no laboratório do Hospital

Universitários da Universidade Federal de Sergipe (HU-UFS). Em 2018 o programa TN encontrou 3,4% de pacientes com traço falciforme e 0,1% com AF em Sergipe.

Os pacientes diagnosticados pela TN devem ser submetidos à fenotipagem eritrocitária estendida antes do início da terapêutica transfusional e serem transfundidos com hemácias com fenótipo idêntico. (PINTO; BRAGA; SANTOS, 2011; ROBERTS et al., 2012; VICHINSKY, 2012a). Essa medida visa reduzir a taxa de aloimunização.

Além de fatores genéticos, envolvendo o genótipo HLA (antígeno leucocitário humano), estudos têm comprovado que o estado inflamatório crônico gerado pela anemia falciforme aumenta o risco de aloimunização. Estão envolvidos nessa inflamação crônica contagem aumentada de leucócitos, citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias, de sinalização e do sistema HLA. (VICHINSKY, 2012b; YAZDANBAKHSI; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012).

O entendimento da fisiopatologia da AF atualmente inclui, além da vasclusão, interações complexas entre o eritrócito, o endotélio e leucócitos. (MUSA et al., 2010). Em modelos animais já se observou que a lesão de isquemia/reperfusão da AF promove elevação de citocinas associadas à atividade de células *Natural Killer* (NK). (WALLACE; LINDEN, 2010). Deste modo, acredita-se que os linfócitos e as células NK podem participar na gênese dos fenômenos clínicos da AF.

Já o traço falciforme (TF) é considerado condição benigna e até assintomática. Porém, a literatura vem mostrando correlação entre o TF e algumas complicações clínicas, como doença renal crônica em estágio avançado, (ALLADAGBIN et al., 2018) morte súbita, (KARK et al., 1987; MITCHELL, 2018) doença vaso-oclusiva (SAXENA et al., 2015) e retinopatia em diabéticos. (HARBI et al., 2016).

O presente estudo avaliou o perfil imunohematológico dos pacientes com AF, fatores relacionados e a relação entre aloimunização e o diagnóstico por TN. Além disso avaliou a distribuição dos linfócitos B, linfócitos T e NK em portadores da hemoglobina S e comparados com indivíduos sem hemoglobinopatias.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Introdução

Os organismos mais desenvolvidos ao longo da evolução necessitaram de um sistema que proporcionasse maior eficácia nas trocas gasosas com o meio, por isso não poderiam depender apenas das difusões simples para tal feito. Nos mamíferos, essa função ficou a cargo dos sistemas respiratório e circulatório, como também dos elementos que constituem o sangue. (MARZZOCO; TORRES, 2017). O transporte de oxigênio dos pulmões até os tecidos, é realizado por meio da hemoglobina (Hb) contida no interior dos eritrócitos. (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

O eritrócito, descrito frequentemente como uma célula funcionalmente simples, apresenta numerosos aspectos relativos à estrutura e propriedades metabólicas extremamente complexas e ainda não totalmente elucidados. (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). A hemoglobina é a subunidade funcional e principal constituinte celular do eritrócito. (PAULING; ITANO, 1949).

Estudar as desordens relacionadas a Hb tem servido de guia para muitos avanços na biologia celular e molecular, além de servir como base para a fisiopatologia de algumas doenças genéticas. Hoje já existem descritas mais de 1000 hemoglobinopatias que afetam tanto o processo de síntese como a própria estrutura da hemoglobina. (THOM et al., 2013). Dentro desse conhecimento, é importante saber relacionar o genótipo ao seu respectivo fenótipo, com o intuito de entender realmente a fisiopatologia e os mecanismos por trás de tais doenças. (FORGET; BUNN, 2013).

A Hb tem grande importância no processo de homeostase do oxigênio e excreção de rejeitos metabólicos ácidos. (THOM et al., 2013). Em sua formação consta de 4 subunidades, cada uma forma uma ligação estável com um grupamento Heme (ferroprotoporfirina IX), situado na porção externa da proteína, permitindo assim uma ligação reversível com os átomos de ferro. Além disso, é preciso que a concha onde se inserem os grupamentos Heme seja suficientemente protetora para evitar que o íon  $\text{Fe}^{+2}$  oxide e transforme-se em  $\text{Fe}^{+3}$ , o qual é incapaz de se ligar ao oxigênio, impossibilitando o seu transporte por essa molécula. (DAILEY; MEISSNER, 2013).

Quase todo o oxigênio transportado pelo sangue está ligado à Hb. Cada porção Heme

pode se ligar a uma única molécula de oxigênio; por conseguinte, a Hb pode então transportar até quatro moléculas de oxigênio. (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

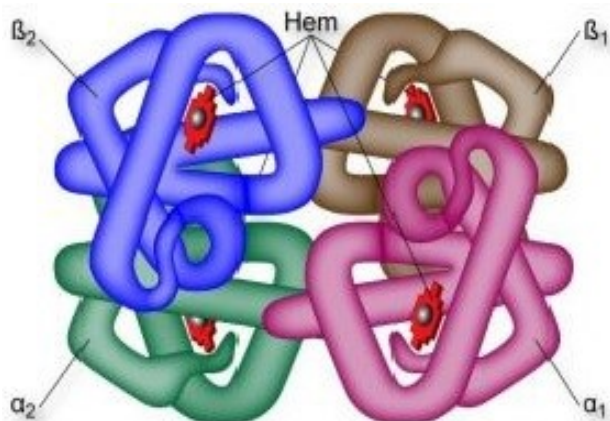
Os eritrócitos ao passarem pelos pulmões têm suas hemoglobinas saturadas em 96% de oxigênio que serão gradualmente liberados para os tecidos. No sangue venoso que retorna ao coração, a hemoglobina está apenas 64% saturada de oxigênio. (NAOUM; NAOUM, 2004). Assim, o sangue que passa através dos tecidos libera perto de um terço do oxigênio que transporta.

Além de tudo que já foi citado acima, o eritrócito tem que ser flexível o suficiente para o transporte do oxigênio via hemoglobina ser funcional. A Hb precisa de um alto índice de solubilidade para que atinja níveis intracelulares adequadamente altos. (MCGANN, 2014).

No adulto normal existem três tipos identificáveis de Hb por meio da eletroforese. A hemoglobina A (HbA) corresponde a 95-98%, a A2 que corresponde a 2-3%, e a fetal (HbF), presente ao nascimento e que tem sua concentração reduzida até os seis meses de vida, corresponde a cerca de 1% do total. (ZÚÑIGA, et al., 2018). Elas são formadas por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa, compostas por uma sequência de 141 aminoácidos, e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- $\beta$ , delta- $\delta$ , gama- $\gamma$  e epsilon- $\epsilon$ ), formada por 146 aminoácidos. A cadeia não alfa determina os tipos mais comuns de Hb tais como HbA ( $\alpha_2/\beta_2$ ), HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), e HbA2 ( $\alpha_2/\delta_2$ ). (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

A estabilidade das moléculas da HbA é dependente do arranjo estrutural tetraédrico que ocorre entre a composição das globinas do tipo alfa e as do tipo beta (Fig. 1). Essa disposição somente é possível devido às ligações físico-químicas de diferentes intensidades que possibilitam a movimentação da molécula durante oxigenação. Assim, pequenas alterações interferem na solubilidade citoplasmática e no transporte de oxigênio. (BUNN, 1997; PAULING; ITANO, 1949).

Figura 1 – Estrutura da hemoglobina A



Fonte: [www.todamateria.com.br/hemoglobina/](http://www.todamateria.com.br/hemoglobina/)

## 2.2 Hemoglobinopatias

As alterações das hemoglobinas envolvem a síntese e quantidade dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias de globinas, bem como as moléculas e as enzimas que participam da formação do grupo heme. Mais de 1000 variantes de Hb já foram descritas até o momento. A maioria delas é originada por simples substituição de aminoácidos, resultante de mudanças na sequência de nucleotídeos. (ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005).

As alterações que envolvem as cadeias das globinas se devem às modificações nos genes responsáveis pelo sequenciamento e pela estrutura de cada polipeptídeo de globina, bem como naqueles destinados à regulação quantitativa da síntese equilibrada entre as globinas alfa e não-alfa. Quando um determinado gene apresenta uma de suas bases nitrogenadas substituída por outra diferente, resulta na formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas alteradas em relação às normais, e são por isso denominadas Hb variantes. (FORGET; BUNN, 2013; ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005). Por exemplo, a HbS se deve à introdução do aminoácido valina (Val) no lugar do ácido glutâmico (Glu) na posição 6 da cadeia polipeptídica da globina beta. Essa anormalidade se deve a uma troca da base nitrogenada adenina (“A”) pela timina (“T”). (INGRAM, 1956).

## 2.3 Síndromes falciformes

O termo “síndromes falciformes” identifica as condições em que o eritrócito sofre falcização após redução na tensão de oxigênio, enquanto a designação “doenças falciformes” é reservada às situações em que a falcização das hemácias conduz a manifestações clínicas evidentes. Assim, as doenças falciformes incluem a AF, que representa o estado homozigoto para a HbS (SS), e as interações HbS-beta talassemia (S/ $\beta$  tal), HbSC e HbSD. É importante observar que nessa definição o estado heterozigoto para HbS (“traço falciforme”) é classificado como síndrome, mas não como doença falciforme. (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; PIEL et al., 2010; WEATHERALL; CLEGG, 2001; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; FERNANDES; AVENDANHA; VIANA, 2017; CAVALCANTI; MAIO, 2011).

O traço falciforme (TF) se apresenta quando apenas um gene da HbS é herdado, ficando assim o genótipo Hb AS. O traço não costuma provocar algum sintoma clínico, já que a quantidade de HbS é inferior à de HbA, o que dificulta a modificação estrutural da molécula. (CAVALCANTI; MAIO, 2011).

## 2.4 Evolução do conhecimento científico da Hb S

As primeiras observações científicas da doença das células falciformes datam de meados do século XIX, publicadas em jornais, boletins médicos e revistas, todos com circulação e distribuição restritas. Por essa razão não são citadas como referências bibliográficas nas publicações sobre doença falciforme. O primeiro relato sobre uma doença comum entre crianças negras com anemia, icterícia e alto grau de mortalidade foi feito pelo médico brasileiro Cruz Jobim em 1835 no Rio de Janeiro. Em 1908, Acciole, um médico da Bahia, publicou um caso de anemia grave, icterícia, dores abdominais e articulares agudas, e úlceras nos membros inferiores, na revista *Arquivos Médicos da Bahia*, de circulação restrita. (NAOUM; NAOUM, 2004; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; RUIZ, 2007).

Efetivamente cabe ao médico James B. Herrick, da cidade de Chicago, a primeira descrição científica em 1910, publicada na revista *Archives of Internal Medicine* de grande circulação internacional. Nesse artigo, Herrick relatou o caso de um estudante que exibia sintomatologia que não era característica de nenhuma doença conhecida. O paciente, um

rapaz negro de 20 anos, nascido na Jamaica, vinha de uma família composta de quatro irmãos e a mãe, todos saudáveis. A história clínica revelou episódios de icterícia, palpitações e dificuldade na execução de exercícios físicos. O exame físico não demonstrou baço ou fígado aumentados. A análise de sangue revelou anemia, policromatofilia, presença de eritroblastos e poiquilocitose, com várias células alongadas “parecidas com foices”. Por essa observação histórica associou-se pela primeira vez a forma afoiçada dos eritrócitos com a presença de anemia grave do paciente. (HERRICK, 2001).

O termo doença falciforme – *sickle cell disease* – foi empregado pela primeira vez por Mason, em 1922. Esse autor relacionou, inclusive, algumas características comuns entre os portadores dessa doença: todos eram negroides, apresentavam icterícia, fraqueza, úlceras maleolares, anemia grave, reticulocitose e eritrócitos falcizados no sangue periférico. (NAOUM; NAOUM, 2004; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Em 1927, Hahn e Gillespie demonstraram a dependência do fenômeno da falcização com a baixa tensão do oxigênio, atribuindo o defeito à Hb, e não somente ao eritrócito. Diggs em 1935 demonstrou que repetidos infartos esplênicos causavam fibrose progressiva no baço. Um momento marcante foi quando Linus Pauling e colaboradores demonstraram que a Hb de um paciente com anemia falciforme apresentava mobilidade eletroforética diferente da Hb de uma pessoa sadia permitindo diagnóstico correto e rápido. (PAULING; ITANO, 1949; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). A Hb anormal extraída de eritrócitos do paciente com anemia falciforme deu-se a denominação de HbS, na qual o “S” representava a primeira letra da palavra *sickle*. A outra Hb extraída de eritrócitos de pessoa adulta sadia deu-se o nome de Hb A, no qual o A representava a primeira letra da palavra *adult*.

Em 1950, Perutz e Mitchison verificaram que as formas oxigenadas de HbA e HbS tinham a mesma solubilidade em soluções hipertônicas; entretanto, quando os experimentos eram realizados sob condições de desoxigenação, a solubilidade da desoxiemoglobina A (desoxi-Hb) diminuía a metade, enquanto a da desoxi-HbS tinha queda aproximada de 100 vezes em relação à sua forma oxigenada. (NAOUM; NAOUM, 2004; ZAGO; PINTO, 2007).

A natureza bioquímica da alteração foi descrita por Ingram, utilizando a técnica de *fingerprinting* de peptídeos de globulinas, demonstrando que a anormalidade química da HbS se deve à substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da globina beta ( $\beta$  6Glu-Val), provocando a perda de duas cargas negativas por molécula de Hb. (INGRAM, 1956).

A partir de 1978, com observações iniciais de Kan e Dozy, e com a introdução de técnicas de biologia molecular, novo impulso foi dado ao estudo da HbS. Através de enzimas

obtidas de bacteriófagos específicos, foi possível admitir que a HbS teve múltiplas origens. Esses estudos foram realizados em populações da raça negra da África, Jamaica e em afro-americanos. Pela análise do agrupamento dos genes tipo beta no cromossomo 11 concluíram que há, pelo menos, cinco tipos de HbS: SS-Benin, SS-Bantu, SS-Senegal, SS-Camarões, SS-Árabe-Indiano. Todas com a mesma mutação, porém, com diferentes extensões de lesões moleculares. (FLEURY, 2001; ROMERO; RENAULD; VILLALOBOS, 1988). Essas descobertas esclareceram em parte a diversidade clínica que se observa em diferentes doentes com AF. A doença associada aos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano é muito mais benigna do que aquela associada aos demais haplótipos. Há indícios de que a doença associada ao haplótipo Banto pode ser a mais grave. No Brasil, os haplótipos mais frequentes são: Banto (66%), Benin (32%) e Senegal (2%), mas com difícil caracterização devido à miscigenação. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018; NAOUM; NAOUM, 2004).

No Brasil, em 1992, o Ministério da Saúde (MS) institucionalizou a Triagem Neonatal no Sistema Único de Saúde (SUS). Na primeira fase abordou somente a fenilcetonúria e o hipotireoidismo congênito. A partir de 2001, através da Portaria 822/01 do MS foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), incluindo as hemoglobinopatias. (BRAGA et al., 2016; LOBO et al., 2011). No Estado de Sergipe (Brasil) a triagem neonatal para hemoglobinopatias só foi iniciado em outubro de 2011.

Com a adição das hemoglobinopatias no programa de triagem, notou-se a necessidade da elaboração de sistema para acompanhamento desses pacientes de forma efetiva. O Ministério da Saúde, estabeleceu em 2005 por meio da portaria nº 1.391 GM/MS a criação da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme (DF) e outras Hemoglobinopatias, para atender as demandas desses pacientes e possibilitar uma melhor assistência. (CANÇADO et al., 2009; LOBO et al., 2011; SIMÕES et al., 2010).

## **2.5 Epidemiologia**

A causa da mutação da Hb S é incerta, contudo, estudos antropológicos associados às análises biomoleculares sugerem que o alelo anormal, para a síntese da globina S, tenha surgido entre os períodos Paleolítico e Mesolítico, aproximadamente há 50 ou 100 mil anos na região centro-oeste da África, Índia e leste da Ásia. (ONDEI; ZAMARO; BONINI-DOMINGOS, 2005).

A alta prevalência foi associada ao nível de proteção que a heterozigose para a

mutação falciforme (traço falciforme) confere contra a malária e à endemicidade dessa doença nessas regiões. A dinâmica das migrações populacionais e o tráfico de escravos africanos garantiram que a distribuição da doença falciforme alcançasse fronteiras além-mar, atravessando o atlântico e chegando às Américas. (AZAR; WONG, 2017; GOLDMAN; AUSIELLO, 2014; PASQUINI, 2013; PIEL; STEINBERG; REES, 2017; ZAGO; FALCÃO; MCGANN; NERO; WARE, 2017).

Para descrever sobre introdução da HbS no Brasil é fundamental conhecer as bases que deram origem à sua população. A população brasileira se caracteriza por grande heterogeneidade genética, derivada da contribuição que lhes deram os seus grupos raciais formadores, muito diversificados, e dos diferentes graus com que eles se inter cruzaram nas várias regiões do país.

O gene da HbS foi difundido de forma heterogênea ao longo de cerca de 300 anos de tráfico de escravos africanos. A quantidade de negros trazidos ao Brasil é bastante discutível, entretanto calcula-se que entre os anos de 1550 e 1850 entraram no Brasil entre 2.500.000 e 4.000.000 de indivíduos. A distribuição do gene da Hb S nas cinco regiões brasileiras mostra a diversidade de prevalências como é demonstrada na figura 2. (NAOUM; NAOUM, 2004).

Figura 2 – Prevalência dos portadores de traço falciforme em alguns estados do Brasil



Fonte: (Murao, Mitiko; Ferraz, Maria Helena C, 2007)

No Brasil, acredita-se que cerca de 25.000 a 30.000 pessoas tenham doença falciforme e que o número de recém-nascido chegue a 3.500 a cada ano. A distribuição do gene da hemoglobina S é bastante heterogênea, dependendo da composição da população, assim

temos nas regiões norte e nordeste uma prevalência maior que nas regiões sul e sudeste do Brasil. (FERNANDES, 2017; CANÇADO et al., 2009).

De acordo com os programas estaduais de Triagem Neonatal temos uma incidência na Bahia de 1:650, no Rio de Janeiro 1:1.300, e em Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais, Goiás 1:1.400, já no Espírito Santo 1:1.800, São Paulo 1:4.000, Rio Grande do Sul 1:11.000, Santa Catarina e Paraná 1:13.500 de nascidos vivos. Em Minas Gerais (PTN-MG), a incidência do traço falciforme é de 3,3% no total aproximado de 250.000 recém-nascidos por ano. (FERNANDES; AVENDANHA; VIANA, 2017; FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010; BRAGA et al., 2016). Estima-se que 7.200.000 indivíduos possuem o traço falcêmico, chegando a uma prevalência de 2 a 8% na população brasileira. (MARTINS; TEIXEIRA, 2017). Em Aracaju, a análise de 1345 doadores de sangue obteve a prevalência de 4,1% de portadores de Hb S. (VIVAS et al., 2006).

Estima-se que no país, 25% das crianças portadoras de AF não cheguem aos cinco anos de vida, além da elevada taxa de mortalidade perinatal que varia entre 20% a 50%. Foi observado ainda que 78,6% dos óbitos ocorreram antes dos 30 anos, e 37,5% concentraram-se nos menores de nove anos. (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

## **2.6 Fisiopatologia**

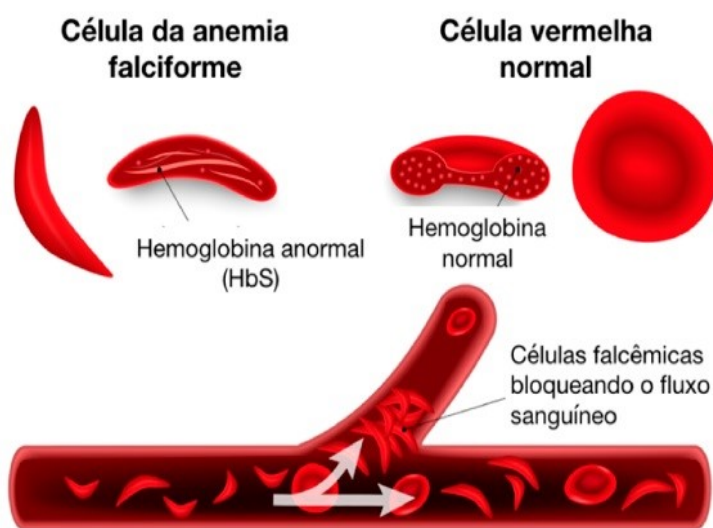
A polimerização da hemoglobina S é o evento fundamental na fisiopatologia da AF, pois, resulta na alteração da forma e da deformabilidade do eritrócito. Essas alterações promovem o aumento da adesão das hemácias ao endotélio e aos leucócitos, causam lesões microvasculares, reduzem a flexibilidade da hemácia e, conseqüentemente sua meia-vida, causam depleção de óxido nítrico (NO) que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e ativam a coagulação. (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017; ZAGO; PINTO, 2007).

Ao perder oxigênio, a HbS diminui sua solubilidade, sofrendo agregação e polimerização (formação de rede de polímeros fibrosos, denominada tactoides). A polimerização da desoxiemoglobina S é um processo altamente complexo que resulta na formação de tetrâmeros HbS gelatinosos em equilíbrio com tetrâmeros em solução. Perturbações nos níveis de oxigênio, temperatura, gradiente eletroquímico, 2-3-DPG e monóxido de carbono interferem na formação dos tactoides. (AZAR; WONG, 2017; ZAGO; PINTO, 2007).



A conversão de HbS de uma substância de fluxo livre em gel viscoso, mediante polimerização, enrijece e distorce o eritrócito, que adquire formato de foice. Após repetidos episódios de afoiçamento e “desafoiçamento”, ocorre lesão da molécula e a hemácia afoiça irreversivelmente, mesmo quando oxigenada, sendo perceptível à hematoscopia de sangue periférico (Fig. 3). (ROBBINS, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2016; ZAGO; PINTO, 2007).

Figura 3 – Eritrócitos normais e falciformes, e vasocclusão



Fonte: (<https://ingoh.com.br/ingoh-explica/o-quee-anemia-falciforme/>)

As hemácias rígidas e indeformáveis transitam com dificuldade pelos sinusoides esplênicos, ficando sequestradas no baço, onde são destruídas pelo sistema fagocitário mononuclear (Fig. 3). A retirada de células anormais da circulação, em velocidade que supera a capacidade da medula óssea de substituí-las, resulta em anemia. As células falciformes têm sobrevida muito curta, de 16 a 20 dias, quando comparada aos 120 dias do eritrócito normal. Além disso, a HbS tem afinidade pelo oxigênio diminuída e, portanto, maior facilidade no transporte de oxigênio para os tecidos. (AZAR; WONG, 2017; NAOUM; NAOUM, 2004; WARE et al., 2017).

Os eritrócitos falciformes ocluem os pequenos vasos sanguíneos, resultando em isquemia e infartos repetidos, que podem acometer qualquer sistema orgânico. A obstrução dos microvasos não se deve apenas a rigidez e ao afoiçamento. (FORGET; BUNN, 2013; ROBBINS, 2001). Os fenômenos vaso-oclusivos levam a lesão por isquemia e reperfusão. Nesse contexto, há a produção de radicais livres que geram estresse oxidativo, potencializam a lesão vascular, ativam o endotélio, consomem NO e facilitam a hemólise.

(SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017; ZAGO; PINTO, 2007).

A falcização dos eritrócitos provoca lesão na membrana, expõe proteínas intracelulares à superfície e leva a produção de radicais livres de oxigênio. Isso desencadeia lesão nas células endoteliais que passam a expressar moléculas de adesão, como VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e E-selectina na superfície celular; produzem citocinas e quimiocinas como interleucina-8 (IL-8), IL-6 e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos). Além disso, o endotélio lesado libera fatores pró-coagulantes e vasoconstritores potentes como endotelina-1 e 2. (FERRONE, 2019; ZAGO; PINTO, 2007).

As células falciformes também expressam um número aumentado de moléculas de adesão se comparadas com glóbulos vermelhos normais. Isso potencializa a adesão das células falciformes ao endotélio e aos leucócitos, propagando o efeito de vasoclusão. (ZAGO; PINTO, 2007).

A hemólise vista da AF tem dois grandes grupamentos. A maior parte dela vem da hemólise extravascular, devido à grande captação de hemácias falcizadas por macrófagos no baço e no sistema retículo endotelial. É válido ressaltar que por mais que ocorra isso de forma acentuada, o baço dos pacientes com anemia falciforme geralmente se apresenta pequeno, devido à formação de traves fibróticas secundárias as lesões de vasoclusão e isquemia-reperusão. A hemólise intravascular, por sua vez, tem sua importância quando se fala em inflamação estéril da AF. A lise de hemácias no leito vascular é condição essencial para a liberação de fatores promotores de inflamação, os DAMPs (padrões moleculares relacionados ao dano). (WAGENER et al., 2003; MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016). Dentre grande parte dos DAMPs liberados na corrente sanguínea, o grupamento heme, procedente da degradação da Hb, tem seu destaque, uma vez que ativa leucócitos e aumenta a expressão de citocinas. (MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; DUTRA; BOZZA, 2014; DUTRA et al., 2014).

Ao sofrerem hemólise, as células falciformes liberam moléculas de Hb no intravascular. Estas levam à redução dos níveis de haptoglobina e da hemopexina que são responsáveis pela degradação da hemoglobina e do grupamento heme, resultando em mais hemoglobina e heme livres que, por sua vez, consomem o NO, levando a vasoconstrição, favorecendo a vasoclusão, inflamação e ativação de plaquetas. (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017; ZAGO; PINTO, 2007).

As células NK são imprescindíveis para a propagação da cascata inflamatória da lesão de isquemia-reperusão, sendo mecanismo vital na fisiopatologia da anemia falciforme.

(CASTRO et al., 1994). A lesão de isquemia-reperfusão a nível hepático já foi associada diretamente com a expansão da ativação de células NK. (SHIMAMURA et al., 2005). Elas apresentam grande poder citotóxico, mas também fazem parte do processo de ativação de linfócitos B e T. (CERWENKA; LANIER, 2002; YOKOYAMA; KIM; FRENCH, 2004).

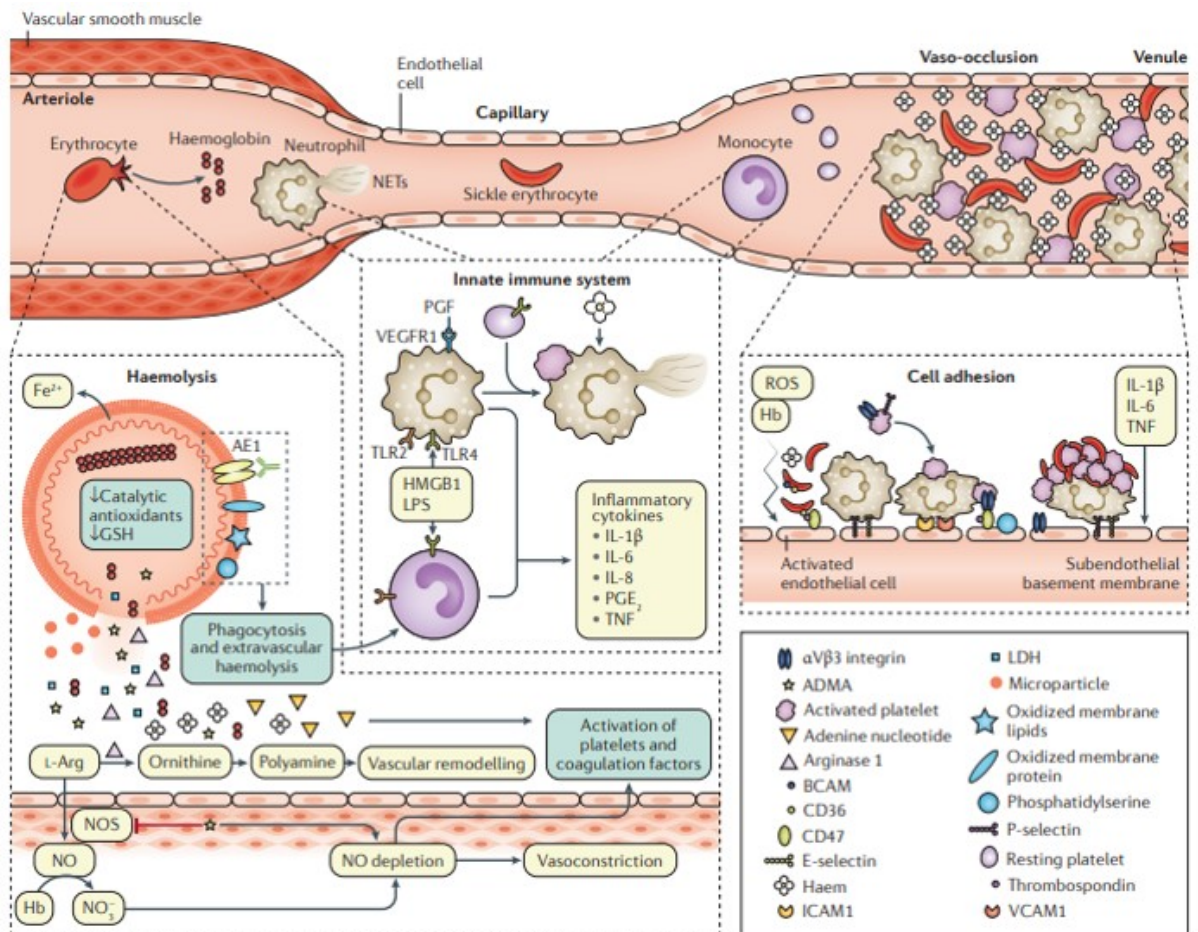
Quanto a classificação no processo de maturação das células NK, vemos dois grupos principais. Elas podem ser divididas em células CD56<sup>bright</sup>, consideradas imaturas, produtoras de altas concentrações de *interferon* gama porém com baixa capacidade citotóxica; e em células CD56<sup>dim</sup>, consideradas maduras e com altas taxas de citotoxicidade. (VIVIER et al., 2008; COOPER et al., 2001).

Na maioria do tempo, os portadores da AF se encontram em um estado estável, no qual a doença mantém determinada estabilidade clínica, porém, não assintomática. No entanto, essas fases são intercaladas com períodos de aceleração da falcização eritrocitária que gera agudização com eventos hemolíticos e vasocclusivos. Esses eventos vaso-occlusivos estão associados a episódios de crises álgicas, que frequentemente requerem hospitalização. Esse ciclo mantido cronicamente é o responsável pelas lesões em múltiplos órgãos. (STUART; NAGEL, 2004; ZAGO; PINTO, 2007).

A interação da HbS com outros tipos de hemoglobina na célula, interfere na polimerização da HbS. Em indivíduos heterozigotos, onde a concentração de HbS normalmente é inferior quando comparado a indivíduos homozigotos, tendem a não formar células falcizadas, pois a HbA e HbF inibe a polimerização da HbS, com exceção aos estados de hipóxia profunda. A HbF tem um poder de inibição maior em comparação com a HbA, por conseguinte, os recém-nascidos são assintomáticos até atingirem 5 ou 6 meses de idade, quando os níveis de HbF normalmente decrescem. Entretanto, alguns indivíduos permanecem expressando níveis de HbF relativamente elevados, condição conhecida como persistência de HbF, que se torna um fator atenuante aos sintomas da AF. (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018; ZAGO; PINTO, 2007).

A figura 4 demonstra a influência da inflamação crônica na fisiopatologia da AF.

Figura 4 – Fisiopatologia da anemia falciforme (inflamação)



Fonte: SPARKENBAUGH; PAWLINKSI, 2017; KATO, 2018

## 2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da DF é estabelecido por meio da presença da HbS e suas alterações moleculares. A comprovação se dá através da realização de exames laboratoriais como a eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose com pH 8.4, em gel de ágar com pH 6.2, e teste de solubilidade da hemoglobina em tampão fosfato concentrado. Pode ser utilizado ainda a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), eletroforese com focalização isoeletrica (IEF) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de sequenciamento do DNA. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018; AZAR; WONG, 2017).

No Brasil, a triagem neonatal é realizada gratuitamente, como um programa do governo conhecido como o “Teste do pezinho”. Em alguns casos, pode ser necessária a realização de teste confirmatório após os seis meses de idade. (FERRAZ; MURAO, 2007).

Quando feito precoce, idealmente no período neonatal, o diagnóstico da AF permite a

introdução da antibioticoterapia, programa de vacinação adequado e educação sobre as complicações da doença, incluindo treinamento dos pais para palpação do baço. (WARE et al., 2017; BRAGA et al., 2016). Estudos comprovam que com a instituição dessas medidas, a mortalidade nos cinco primeiros anos de vida é reduzida de cerca de 25% para apenas 3%. (BRAGA et al., 2016; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Após ser realizado o diagnóstico, os familiares devem também ser investigados, pela possibilidade de outros casos na família. (BRAGA et al., 2016; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Esses dados devem balizar o aconselhamento genético e educacional, além de possibilitar o correto acompanhamento dos casos diagnosticados, objetivando reduzir a morbidade e a mortalidade nessa população. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018).

## **2.8 Quadro clínico**

O quadro clínico da AF, contrastando com as demais formas de anemia hemolítica, não depende apenas dos sintomas causados pela anemia propriamente dita, mas sim da ocorrência de lesões orgânicas causadas pela obstrução vascular e das chamadas “crises de falcização”. Nos períodos entre as crises os pacientes evoluem praticamente assintomáticos com níveis de hemoglobina variáveis, em geral, ao redor de 8g/dl. Contribui para relativa ausência de sintomas a acentuada redução da afinidade da Hb S para oxigênio. Dessa forma, uma menor concentração de hemoglobina ainda disponibiliza quantidades adequadas de oxigênio nos tecidos. (NUZZO; FONSECA, 2004; ZAGO; PINTO, 2007).

De modo geral, a AF caracteriza-se por numerosas complicações, que podem afetar quase todos os órgãos e sistemas, com expressiva morbidade, redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida. Além de manifestações de anemia crônica, o quadro é dominado por episódios de dores osteoarticulares, dores abdominais, infecções e infartos pulmonares, retardo do crescimento e maturação sexual, acidente vascular cerebral e comprometimento crônico de múltiplos órgãos, sistemas e aparelhos. (LIONNET et al., 2012; FERNANDES; AVENDANHA; VIANA, 2017; WARE et al., 2017).

Apesar de todo o progresso que ocorreu nos últimos anos, o prognóstico do paciente com doença falciforme permanece difícil de ser entendido devido à grande diversidade de manifestações clínicas, das variáveis que ocorrem entre diferentes faixas etárias, das condições socioeconômicas e da qualidade dos serviços de saúde. Isso porque a clínica da AF depende de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais. (NAOUM; NAOUM, 2004;

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018). O paciente com AF eventualmente necessita de hospitalizações. Estas se concentram em jovens, com 70% das internações em menores de 19 anos. O principal problema clínico é a crise dolorosa seguida de síndrome torácica e infecções. Normalmente as internações duram em média 5 dias. (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

## **2.9 Traço falciforme: um espectro da doença falciforme?**

### **2.9.1 Repercussões clínicas**

Durante muito tempo acreditou-se que a condição de traço falciforme (TF) seria benigna e até assintomática. Porém, a literatura científica vem mostrando correlação entre o TF e algumas condições clínicas, merecendo destaque a doença renal crônica em estágio avançado, (ALLADAGBIN et al., 2018) morte súbita (MEASE; LONGO; HAKAMI, 1976; MITCHELL, 2018; KARK et al., 1987) doença vaso-oclusiva (SAXENA et al., 2015) e retinopatia diabética, (HARBI et al., 2016) muitos desses notados em atletas com alto rendimento, onde pode existir baixa oxigenação tecidual. (QUATTRONE et al., 2015).

A doença renal crônica pode surgir mediante condições que gerem hipóxia renal, e por sua vez pode ser agravada em pacientes com TF. Eles apresentaram maior prevalência de albuminúria, menor taxa de filtração glomerular e mais incidência de doença renal crônica. (HARBI et al., 2016). Um estudo nacional realizado por Alladagbin e colaboradores (2018) revelou que pacientes com doença renal em estágio avançado que estavam em hemodiálise tinham uma maior frequência de TF. (ALLADAGBIN et al., 2018).

A associação entre TF e morte súbita ainda parece obscura. Estudos recentes demonstraram correlação entre eles nos indivíduos submetidos a estresse físico extenuante. Devido a fatores como desidratação, estresse oxidativo elevado, altitude, altas temperaturas e condicionamento físico baixo, a viscosidade sanguínea seria alterada, levando a mais falcização intravascular, propiciando a mais eventos microvasculares e até a morte súbita. (QUATTRONE et al., 2015; MITCHELL, 2018).

## 2.10 Tratamento

Idealmente, o acompanhamento dos pacientes com AF deve ser feito por uma equipe multidisciplinar formada pelas equipes médica, de enfermagem, fisioterapia, psicologia e assistência social. Esse acompanhamento deve ser feito em centros especializados, que possibilitem consultas regulares com hematologistas para possibilitar o tratamento adequado e o diagnóstico das complicações crônicas. (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Para o sucesso do tratamento, o paciente deve ser educado em relação à prevenção de infecções, manejo da dor e detecção precoce das complicações clínicas. (AZAR; WONG, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018).

Além do tratamento das complicações agudas e crônicas da AF, o manejo terapêutico se pauta também na prevenção de crises de falcização e fenômenos vasoclusivos.

### 2.10.1 Hidroxiureia (Hidroxycarbamida)

A hidroxycarbamida é um agente farmacológico que apresenta a propriedade de induzir a produção de hemoglobina fetal (HbF) por ativar a transcrição da cadeia  $\gamma$  da hemoglobina, mesmo na idade adulta. Como já descrito na fisiopatologia, a HbF inibe a polimerização da hemoglobina S, que por sua vez reduz a falcização do eritrócito. (AZAR; WONG, 2017).

Estudos multicêntricos do uso da hidroxycarbamida mostraram redução de 50% dos eventos vaso-oclusivos, aumento dos níveis totais de hemoglobina e de HbF, redução na incidência de STA, necessidade de hemotransfusões e mortalidade quando comparado com placebo. (AGRAWAL et al., 2014; THORNBURG; CALATRONI; PANEPINTO, 2011). Além disso, atestaram a baixa toxicidade desse medicamento e a segurança no seu uso crônico. (CANÇADO et al., 2009; BISPO; IVO, 2013).

Ao ativar a expressão dos genes  $\gamma$ -globina e aumentar os níveis de hemoglobina circulante nos pacientes falcêmicos, a hidroxycarbamida leva ao aumento do volume corpuscular médio que melhora a deformabilidade da hemácia ao passar pelos capilares. (AZAR; WONG, 2017). Funciona também reduzindo a inflamação crônica e reduzindo o risco de eventos tromboembólicos por diminuir a contagem de leucócitos, de plaquetas, a expressão de moléculas de adesão ao endotélio e aumentar a disponibilidade de NO na

circulação. (AZAR; WONG, 2017; BRAGA, 2007/15; GUTERRES, 2005).

O uso da hidroxycarbamida está indicado na faixa terapêutica de 15-35 mg/kg/dia para os pacientes acima de dois anos de idade que apresentem três ou mais crises vaso-oclusivas nos últimos doze meses; dois episódios de síndrome torácica aguda; um episódio de priapismo grave ou priapismo recorrente; necrose isquêmica óssea; insuficiência renal; proteinúria maior que 1g/24h; anemia grave e persistente ( $Hb < 6g/dl$  nas últimas três dosagens num período de três meses); desidrogenase láctica elevada duas vezes acima do normal nas crianças e três vezes acima do normal nos adolescentes e adultos; alteração no Doppler transcraniano; retinopatia proliferativa ou comprovação de lesão em outros órgãos. (CANÇADO et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018).

#### 2.10.2 Transplante de medula óssea

O transplante de células-tronco hematopoiéticas permanece como única forma de cura da doença falciforme, sendo a origem mais frequente do tecido a ser doado a medula óssea de parente compatível. Porém, surge como alternativa o transplante de células-tronco oriundas do cordão umbilical. (WARE et al., 2017; SIMÕES et al., 2010).

É indicado para crianças com casos graves de anemia falciforme, por exemplo, as que apresentam episódio de AVE na infância. O transplante de células-tronco hematopoiéticas tem apresentado bons resultados nessa faixa etária, mas os estudos ainda são limitados em adultos. (SIMÕES et al., 2010; SIMÕES et al., 2016).

No Brasil foi incorporado ao Sistema Único de Saúde o transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico aparentado para os pacientes com AF (crianças e adultos). (SIMÕES et al., 2010; SIMÕES et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2018).

#### 2.10.3 Novas terapêuticas

A terapia gênica se apresenta como uma possibilidade futura de cura da AF. Nela, são isoladas e cultivadas células da medula óssea do paciente que são inoculadas com vírus contendo um gene adicional que pode codificar uma  $\beta$ -globina anti-falcizante ou HbF. Após tratamento quimioterápico mieloablativo, o paciente recebe reinfusão de células-tronco hematopoiéticas autólogas modificadas, tal qual no transplante heterólogo, que repovoarão a



medula óssea e expressarão o novo gene. Ensaios clínicos realizados com pacientes graves têm apresentado resultados encorajadores. (SIMÕES et al., 2016).

Como a adesão eritrocitária e leucocitária tem um papel importante na fisiopatologia da anemia falciforme, tem-se pesquisado agentes farmacológicos que reduzam a expressão das moléculas de adesão E-selectina e P-selectina. Como opção surge o Rivipansel, um inibidor pan-selectina, que demonstrou reduzir o tempo médio de resolução de eventos vaso-oclusivos em 28%, assim como uma redução de 83% na dose média acumulada de analgésicos opioides intravenosos. O Crizanlizumabe, um inibidor da P-selectina, também se apresenta como uma opção nesse contexto. (WARE et al., 2017).

O Velopoxamer diminuiu a duração das crises vaso-oclusivas em crianças e em pacientes que já faziam uso da hidroxycarbamida, por possuir a capacidade de modular a tensão superficial dos eritrócitos tendo como alvo os domínios hidrofóbicos expostos na lesão da membrana das hemácias. (WARE et al., 2017). Embora promissores, essas possibilidades terapêuticas devem levar alguns anos até que estejam disponíveis no mercado. (ABRAHAM; JACOBSON; BOLLARD, 2016).

#### 2.10.4 Terapia transfusional

Um importante tratamento da AF continua sendo a hemotransfusão, com mais de 90% dos pacientes portadores dessa afecção já tendo sido submetidos à transfusão de hemácias pelo menos uma vez na vida. (WARE et al., 2017). Os objetivos das hemotransfusões são: reduzir a anemia, diminuir os níveis de HbS circulante e aumentar a capacidade de transporte do oxigênio aos tecidos. (CHOU; FASANO, 2016; CHOU, 2013).

Além da transfusão simples, a exsanguineotransfusão e a eritrocitaférese podem ser úteis em determinadas situações. Dentre as indicações dessas outras modalidades estão a necessidade de hemotransfusão com Hb pré-transfusional  $> 9$  g/dl para evitar hiperviscosidade sanguínea e como tratamento do acidente vascular encefálico. A exsanguineotransfusão parcial pode ser indicada nos casos em que a Hb prétransfusional encontra-se em níveis maiores que 8,5 g/dl. Em cada situação, o médico deve avaliar a disponibilidade de material, pessoal capacitado e equipamento adequado antes de decidir qual terapêutica usar. (CHOU; FASANO, 2016; CHOU, 2013).

As indicações da terapêutica transfusional na anemia falciforme são: crise aplástica após infecção pelo parvovírus B19, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda, hepatopatia

falciforme aguda ou sequestro hepático agudo, disfunção de múltiplos órgãos, pré-operatório, complicações neurológicas, hemorragia aguda, angina ou isquemia miocárdica e eventos vaso-oclusivos durante a gestação. (ZAGO; PINTO, 2007; WARE et al., 2017; CHOU; FASANO, 2016; CHOU, 2013).

#### 2.10.4.1 *Aloimunização pós-transfusional*

A transfusão de concentrado de hemácias não é uma terapêutica inócua, podendo levar à produção de auto e aloanticorpos (aloimunização), com sérias complicações aos pacientes. Dentre essas complicações, a principal é a reação transfusional hemolítica tardia, que determina queda significativa nos níveis de hemoglobina, sugerindo a presença tanto de auto como de aloanticorpos. Nesses casos, transfusões adicionais tendem a baixar ainda mais os valores de hemoglobina, causada pela hiperhemólise. (YAZDANBAKHSI; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012). Além disso, a aloimunização eritrocitária limita a disponibilidade de concentrados de hemácias disponíveis para futuras hemotransfusões, devido à dificuldade em se encontrar sangue compatível. (HELMAN; CANÇADO; OLIVATTO, 2011; TELEN et al., 2015; LASALLEWILLIAMS et al., 2011).

A aloimunização é desencadeada pela exposição do sistema imune a antígenos eritrocitários durante a transfusão de hemácias ou a gestação. Os antígenos mais frequentemente envolvidos na aloimunização eritrocitária são os do grupo Rh, Kell, Kidd, Duffy, Lewis e MNS. (HELMAN; CANÇADO; OLIVATTO, 2011). Após a exposição, os antígenos são reconhecidos, processados, apresentados aos linfócitos T CD-4 *helper* que, ativados, interagem com linfócitos B culminando na sua diferenciação em plasmócitos que produzirão imunoglobulinas contra os antígenos eritrocitários. (YAZDANBAKHSI; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012). Essa incompatibilidade se dá pelo polimorfismo antigênico entre antígenos eritrocitários de doadores e receptores, levando a taxas de aloimunização que variam entre 2,5 - 75% segundo Helman et al. (2011) e 18 - 47% em outros estudos. (HELMAN; CANÇADO; OLIVATTO, 2011; NICKEL et al., 2016; TELEN et al., 2015). Já a produção de autoanticorpos se dá pelo desbalanço entre os estímulos patogênicos pró-inflamatórios e os mecanismos de regulação do sistema imunológico, levando à produção de linfócitos T CD-4 *helper* autorreativos que estimulam a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de autoanticorpos. (YAZDANBAKHSI; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012).

Além de fatores genéticos, envolvendo o genótipo HLA (antígeno leucocitário humano), estudos têm comprovado que o estado inflamatório crônico gerado pela AF aumenta o risco de aloimunização. (YAZDANBAKHSH; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012; VICHINSKY, 2012b). Outros fatores que predisõem à aloimunização são a idade, o sexo, número de transfusões recebidas e intervalo de tempo desde a última transfusão. (YAZDANBAKHSH; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012; HELMAN; CANÇADO; OLIVATTO, 2011). Alves Pinto et al. (2011) mostraram que para cada ano a mais no intervalo entre a última transfusão e a pesquisa do anticorpo eritrocitário existe um aumento de 36,9% da probabilidade de o paciente estar aloimunizado. (PINTO; BRAGA; SANTOS, 2011). O mesmo estudo comprovou que o risco de aloimunização aumenta 16 vezes naqueles pacientes que receberam mais de dez hemotransfusões se comparados com aqueles que receberam menores quantidades. Afirma também que 80% dos pacientes aloimunizados haviam recebido mais que 10 unidades de hemácias. (PINTO; BRAGA; SANTOS, 2011).

A presença de anticorpos contra antígenos eritrocitários está relacionada com aumento da prevalência de dor crônica e redução da sobrevida em comparação com pacientes não aloimunizados. (TELEN et al., 2015). O aumento de complicações relacionadas a aloimunização reforça a necessidade de se introduzir medidas profiláticas para a produção de anticorpos eritrocitários. A fenotipagem eritrocitária dos doadores e dos pacientes, e a escolha de hemocomponentes fenótipos idênticos previnem a aloimunização dos pacientes falciformes. (LASALLE-WILLIAMS et al., 2011; VICHINSKY, 2012b).

Assim, conhecer a prevalência e o perfil de desenvolvimento de aloanticorpos em uma coorte de pacientes portadores de AF contribuirá para o entendimento das complicações relacionadas às transfusões de hemácias e, consequentemente, para a elaboração de estratégias de prevenção da aloimunização e de suas consequências. Além disso, avaliar aspectos inflamatórios dos pacientes com AF pode justificar a grande variabilidade clínica desses pacientes e a influência da inflamação na aloimunização.

Em contrapartida, ainda não se sabe se as alterações clínicas nos pacientes com traço falciforme podem estar relacionadas com a presença da hemoglobina S e consequentemente com ativação da inflamação crônica, sendo necessários novos estudos para entendimento desses pacientes sintomáticos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

- Avaliar o perfil imunohematológico e a distribuição dos linfócitos nos portadores de anemia falciforme

#### **3.2Específicos:**

- 1) Determinar a frequência de antígenos e anticorpos eritrocitários; e taxa de aloimunização nos pacientes com AF;
- 2) Determinar fatores relacionados a aloimunização e a influência da triagem precoce neonatal;
- 3) Comparar os valores dos linfócitos (linfócitos B, linfócitos T e NK) entre os portadores de anemia falciforme, traço falciforme e indivíduos sem qualquer hemoglobinopatia.

## **4 MÉTODOS**

O estudo foi dividido em duas partes: a primeira trata-se de um estudo transversal aninhado a uma coorte histórica e a segunda um estudo transversal controlado.

### **4.1 Parte 1**

A amostra foi constituída por pacientes portadores de AF, acompanhados no Serviço de Hematologia Benigna do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU-UFS) e que compareceram as consultas no ano de 2016. Foram realizadas revisões dos prontuários dos pacientes para coleta dos dados sociodemográficos (idade, sexo e procedência) e clínicos.

#### **4.1.1 Exames laboratoriais**

Foram coletados os resultados dos últimos 5 exames de rotina dos pacientes: hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), reticulócitos, leucócitos, monócitos, plaquetas, aminotransferase de aspartate (AST), aminotransferase de alanine (ALT), bilirrubina indireta (BI) e desidrogenase láctica (LDH). Esses exames foram realizados no laboratório do Hospital Universitário com as técnicas padronizadas: hemograma (contagem automatizada), AST e ALT (teste colorimétrico), bilirrubinas (teste colorimétrico), LDH (teste cinético), microalbuminúria (imunoturbidimetria) e reticulócitos (coloração supravital com azul de crezil).

#### **4.1.2 Ecocardiograma**

Os ecocardiogramas foram realizados em ecocardiógrafo Nemio XG® (Toshiba). A avaliação do ventrículo esquerdo foi obtida através das variáveis: espessura diastólica final do septo interventricular (SIV), espessura diastólica final da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDVE) e diâmetro

sistólico final do ventrículo esquerdo (DSVE). A espessura relativa da parede (ERP) foi obtida pela fórmula  $ERP = (SIV + PPVE) / DDVE$ .

A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi calculada através da fórmula proposta por Devereux et al, na qual  $MVE \text{ (gramas)} = 0,8 \{1,04[(DDVE + SIV + PPVE)^3 - DDVE^3]\} + 0,6$ , posteriormente corrigida para altura (IMVE) e aplicada a curvas de percentil específicas para sexo e idade. Hipertrofia do ventrículo esquerdo foi diagnosticada quando o IMVE resultar num valor superior ao do percentil P95 para sexo e idade.

A geometria do ventrículo esquerdo foi classificada de acordo com os valores da ERP e do IMVE como: hipertrofia concêntrica (presença de HVE e  $ERP > 0,42$ ), hipertrofia excêntrica (presença de HVE e  $ERP \leq 0,42$ ), remodelamento concêntrico (ausência de HVE e  $ERP > 0,42$ ) e normal (ausência de HVE e  $ERP \leq 0,42$ ).

#### 4.1.3 Doppler transcraniano

O doppler transcraniano foi realizado usando o dispositivo WAKI-I (Átis Medical®), pelo mesmo examinador e técnica. Avaliadas as velocidades das artérias cerebral média, cerebral anterior, cerebral posterior, vertebral e basilar. Valores acima de 200 cm/s foram considerados alterados e os pacientes classificados como portadores de vasculopatia cerebral.

#### 4.1.4 Avaliação transfusional

Em seguida foram obtidos os dados transfusionais dos pacientes no Hemocentro de Sergipe (HEMOSE): total de transfusões (número de unidades transfundidas) por paciente e resultados dos exames pré transfusionais.

Os exames imunohematológicos foram realizados como rotina pré-transfusional no laboratório de imuno-hematologia do HEMOSE. Foram realizados tipagem sanguínea, pesquisa de anticorpos por meio da prova de coombs direto e indireto; e fenotipagem eritrocitária estendida (antígenos A, B, D, C, c, E, e, K, k, cw, M, N, S, s, Fy(a), Fy(b), Kpa, Kpb, JK(a), JK(b), P1, Lea, Leb, Lua, Lub). Nas amostras que apresentaram anticorpos irregulares foram realizadas as identificações através da reação de painel de hemácias marcadas, usando o método de aglutinação em coluna e de centrifugação em gel (Biorad®). Técnicas adicionais para identificação dos anticorpos (eluato, aloadsorção e autoadsorção) não foram realizadas.

#### 4.1.5 Análise dos dados

O banco de dados foi organizado e tabulado no programa Microsoft Office Excel 2016, e a análise estatística foi realizada no programa Epi info.

As variáveis numéricas foram expressas através de medidas de tendência central: média, valores mínimos e máximos, e as comparações entre grupos foram feitas por meio de um teste de médias (teste “t” independente ou pareado). As variáveis categóricas foram expressas em valores proporcionais e absolutos, e as comparações entre grupos, pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. O nível de significância estatística foi  $p < 0,05$ .

### 4.2 Parte 2

Foram incluídos pacientes adultos (acima de 18 anos) portadores de AF, indivíduos portadores de TF e indivíduos sem qualquer hemoglobinopatia, confirmados por eletroforese de hemoglobina. Os pacientes foram recrutados a partir da demanda espontânea do serviço ambulatorial na Universidade Federal de Sergipe (UFS). Pacientes homozigotos para hemoglobinopatia S (SS) foram convidados para compor o grupo SS. Familiares de primeiro grau (pai, mãe e irmãos) dos pacientes foram convidados para compor o grupo AS (TF). O grupo controle (AA) foi recrutado a partir da população de estudantes de graduação e pós-graduação da UFS. Todos os participantes autorizaram a sua participação na pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram excluídos pacientes com histórico de crise algica, infecção e internação nas quatro semanas que antecederam a coleta; quaisquer indivíduos com histórico de transfusão sanguínea nos 120 dias que antecederam a coleta; pacientes em uso de hidroxycarbamida; pacientes com histórico de doenças nas quatro semanas ou uso de drogas anti-inflamatórias nas 24 horas que antecederam a coleta.

Para a determinação dos linfócitos foi coletado 15 ml de sangue periférico no tubo com heparina, seguido de isolamento de células mononucleares e realização de imunofenotipagem em citômetro de fluxo de 8 canais (FCASCanto II da BD Biosciences®). O processo de isolamento dos linfócitos foi iniciado com a centrifugação da amostra em solução de Ficoll-Hypaque, em seguida, a amostra foi lavada por duas vezes com solução salina. Quantidades fixas de linfócitos ( $1 \times 10^6$  células) foram dispostas em placas com 48

poços com o meio de cultura. Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa de óxido de carbono, para preservação das células.

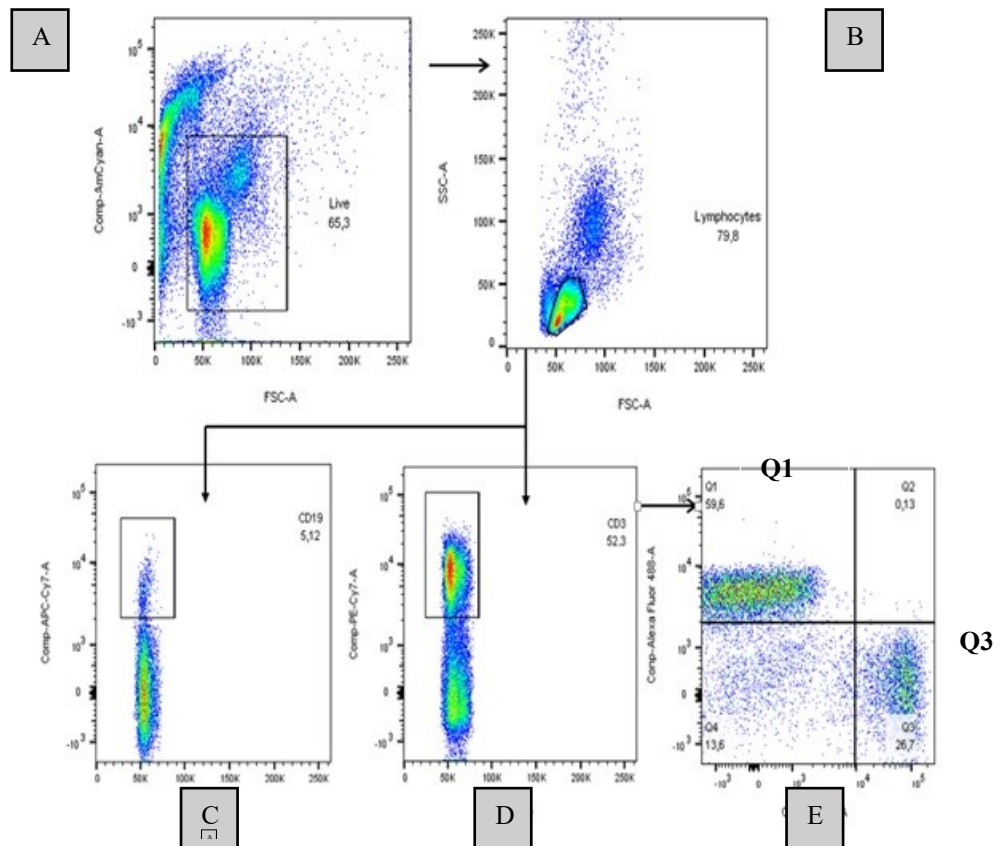
Após a preparação das placas para marcação de anticorpos de superfície, as mesmas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4° C, lavadas com solução tampão fosfato salino (PBS) e bloqueadas com solução contendo 2% de soro fetal bovino. Somente após isso, as células receberam marcação para os oito seguintes anticorpos de superfície: CD3; CD4; CD8; CD14; C19; CD56; CD16 e CD69. O painel utilizado para avaliação de linfócitos B e linfócitos T (CD4 e CD8), continha os seguintes anticorpos monoclonais: CD3PECy7; CD4FITC, CD8PEcy5; CD14PE e CD19APCy7. Já para a identificação de células NK os seguintes anticorpos monoclonais foram utilizados: CD3PEcy7; CD16APC, CD56BV421 e CD69APCy7.

Após a adição dos marcadores dos anticorpos de superfície, as células foram novamente incubadas por 30 minutos e nova lavagem com PBS foi realizada, com centrifugação a 1500 rpm, a 4° C por 5 minutos. Em seguida, visando diferenciar as células vivas das mortas e/ou de fragmentos celulares, foi realizada marcação com anticorpo anti-humano Live/Dead AmCyan. Nova incubação de 30 minutos foi realizada, seguida de nova lavagem com PBS, a fim de eliminar células e fragmentos não-vivos. Por fim, as células foram resuspensas em 300µL de PBS e então colocadas no citômetro de oito cores FCASCanto II da BD Biosciences® para a imunofenotipagem.

A seleção de *gates* para análise dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi iniciada a partir do tamanho relativo celular (FSC) cruzada com anticorpos Live/dead AmCyan, o que isolou uma janela cuja população consistia de pequenas células que apresentavam marcadores para células vivas. Posteriormente, as células isoladas por FSC foram analisadas segundo a sua granularidade (SSC), com *gate* nas células de menor granularidade – linfócitos (Fig. 5).



Figura 5 – Histograma com estratégia de análise de linfócitos B e linfócitos T (CD4 e CD8).



Fonte: autor

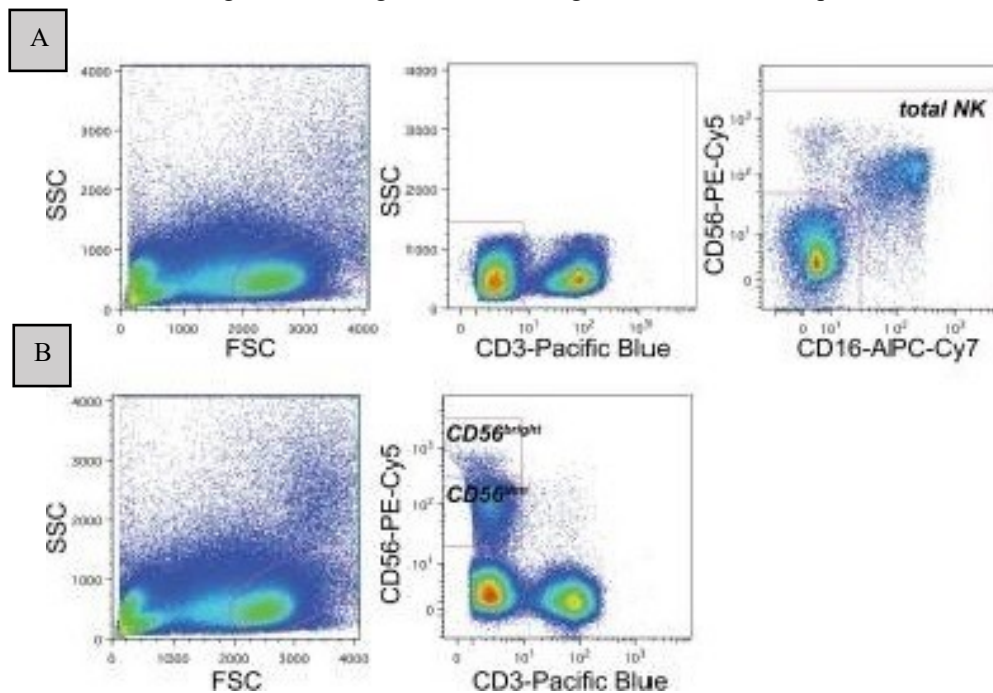
**A:** análise de FSC por Live/dead AmCyan, com gate nas células vivas. **B:** Análise de FSC por SSC, com gate na região de linfócitos. **C:** Análise de FSC por CD19 APCy7, com gate nas células CD19+ (linfócitos B). **D:** Análise FSC e CD3 PEcy7 com gate nas células CD3+ (linfócitos T). **E:** Análise a partir do gate de células CD3+, avaliação de CD8 PEcy5 por CD4 FITC.

Os linfócitos, então, foram analisados segundo os antígenos de superfície que apresentavam: a análise de FSC por marcadores PEcy7 e APCy7 isolaram populações de pequeno tamanho e que expressaram, respectivamente, CD3+ ou CD19+ em sua superfície. Por fim, as células isoladas pelo *gate* para CD3+ foram analisadas para CD4 FITC e para CD8 PEcy5 (Canal PerCP), diferenciando quatro subtipos celulares. Aquelas células presentes no quadrante “**Q1**” são linfócitos T CD4+ e no quadrante “**Q3**”, linfócitos T CD8+ (Fig. 5).

Para análise das células NK e suas subpopulações as duas etapas iniciais da análise anterior foram seguidas: análise de FSC com anticorpos Live/Dead AmCyan, isolando células

vivas, posteriormente analisadas por FSC com SSC exibindo *gate* para linfócitos. Após o isolamento do *gate* para linfócitos vivos, marcadores de superfície para células NK foram estudados. Prosseguiu-se a análise por SSC com CD3 PEcy7, exibindo *gate* para células CD3 negativo. Análise com CD16APC e CD56BV421 para avaliação das células NK totais. Posteriormente análise de FSC por SSC, com *gate* na região de linfócitos e análise CD56 e CD3 com *gate* para CD3- CD56 (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>) (Fig. 6).

Figura 6 – Histograma com estratégia de análise dos subtipos de células NK.



Fonte: SLYKER et al (2013)

**A:** Análise de FSC por SSC, com *gate* na região de linfócitos. Análise de SSC por CD3 PEcy7 APCy7, com *gate* nas células CD3- e análise CD16 e CD56. **B:** Análise de FSC por SSC, com *gate* na região de linfócitos Análise CD56 e CD3 com *gate* para CD3- CD56 (CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>).

No painel sem a coloração CD16APC, as células NK foram identificadas como linfócitos CD3- que eram brilhantes (CD<sup>bright</sup>) ou escuros (CD<sup>dim</sup>) para a coloração de CD56BV421. O CD56 negativo não foi utilizado (Fig. 6).

#### 4.2.1 Análise dos dados

A análise dos subtipos de linfócitos e células NK foi realizada no *software Flowjo*. Os dados coletados foram tabulados no programa GraphPad Prism 7.00 e os resultados referentes

às variáveis numéricas foram expressos através de medidas de tendência central: média e valores mínimos e máximos. Para análise da distribuição das variáveis foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk*. A comparação das médias entre os diferentes grupos foi realizada pelos testes ANOVA ou *Kruskal-Wallis*. O nível de significância estatística foi  $p < 0,05$ .

### **4.3 Considerações éticas**

Os Projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe. A Parte 1, com número do parecer 342.618, foi aprovada em 17/07/2013 e a parte 2, com o número CAAE 56276116.10000.5546, foi aprovada em 18/11/2016.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Parte 1 (Aspectos imunohematológicos)

No ano de 2016 foram atendidos no ambulatório 420 pacientes com hemoglobinopatias. Foram excluídos os pacientes com diagnóstico recente com falta de dados e exames, pacientes com acompanhamento irregular e pacientes que os prontuários não foram localizados. Após as exclusões restaram 326 pacientes, destes 270 (82,8%) são portadores de AF, 45 (13,8%) HbSC, 1 (0,3%) HbSD e 10 (3,0%) Sbeta talassemia (HbS $\beta$ ), melhor visualizado na figura 7.

Figura 7 – Desenho da coorte



A amostra utilizada no estudo foi composta por 270 pacientes com anemia falciforme. A frequência de pacientes do sexo masculino foi de 52,94% (143) e a média de idade encontrada na amostra foi de 13,9 anos. Desses, 71 pacientes (26,2%) foram diagnosticados pela triagem neonatal.

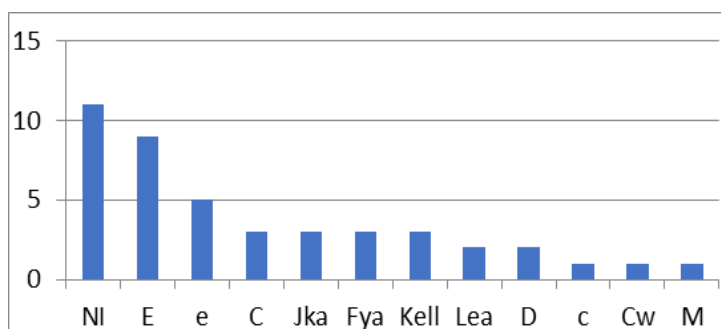
Foram testados 22 tipos de antígenos eritrocitários e as frequências encontradas estão apresentadas na Tabela 1, sendo os mais prevalentes “e”, “c” e “Kpb”. Nem todos os pacientes realizaram a fenotipagem estendida completa justificando a diferença no número de pacientes em cada antígeno pesquisado.

Tabela 1 – Frequência de antígenos eritrocitários nos pacientes com anemia falciforme.

Antígenos	Total pacientes (n)	Positivo (n)	%
<b>C</b>	169	92	54,4
<b>c</b>	169	156	92,3
<b>E</b>	169	54	31,9
<b>e</b>	169	163	96,4
<b>Cw</b>	167	3	1,8
<b>Duffy a</b>	164	90	54,8
<b>Duffy b</b>	166	94	56,6
<b>JK a</b>	155	130	83,8
<b>JK b</b>	155	100	64,5
<b>K</b>	152	151	99,3
<b>Kell</b>	170	7	4,1
<b>Kpa</b>	155	11	7,1
<b>KpB</b>	156	155	99,3
<b>Lewis a</b>	156	27	17,3
<b>Lewis b</b>	156	94	60,2
<b>Lutheran a</b>	156	26	16,7
<b>Lutheran b</b>	157	152	96,8
<b>M</b>	164	136	82,9
<b>N</b>	163	127	77,9
<b>S</b>	165	88	53,3
<b>s</b>	167	153	91,6
<b>P1</b>	156	144	92,3

Entre os pacientes que receberam transfusão haviam 34 pacientes aloimunizados (19,6%). Não foi possível pelas técnicas utilizadas a identificação de 25% dos anticorpos encontrados (NI). Foram identificados 11 diferentes tipos de anticorpos, sendo mais prevalentes anti-E, anti-e, anti-C, anti-JKa, anti-Fya e anti-Kell, conforme a Figura 8. Foram identificados 6 pacientes negativos para antígeno “e” e destes, 5 estão aloimunizados com anti-e.

Figura 8 – Frequências (número) dos anticorpos irregulares dos pacientes com AF



A presença de autoanticorpos foi maior nos pacientes aloimunizados em comparação com os pacientes não aloimunizados (Tab. 2). Dos exames laboratoriais avaliados, somente o VCM associou-se a aloimunização ( $p=0,036$ ), tendo sido observado valor mais elevado de VCM entre os pacientes aloimunizados. (Tab.2).

Tabela 2: Comparação entre as variáveis epidemiológicas e clínicas e aloimunização.

	Aloimunização (sim)	Aloimunização (não)	<i>P</i>
<b>Idade (anos)</b>			
<b>Média</b>	18,1	14,5	0,026*
<b>Min-máx</b>	4-36	1-37	
<b>Hidroxycarbamida</b>			
<b>Sim</b>	21 (61,7%)	56 (40,3%)	0,019**
<b>Sexo</b>			
<b>Masculino</b>	20 (58,8%)	68 (48,9%)	0,19**
<b>Triagem neonatal</b>			
<b>Sim</b>	2 (5,9%)	23 (16,5%)	0,08***
<b>Não</b>	32 (94,1%)	116 (83,5%)	
<b>Coombs direto</b>			
<b>Sim</b>	25 (73,5%)	4 (2,9%)	0,00007***
<b>Não</b>	9 (26,5%)	133 (97,1%)	

\* teste t; \*\* teste qui-quadrado; \*\*\* exato de Fisher

Não foi observada associação da presença de aloimunização na frequência de internações. Por outro lado, o número de transfusões foi determinante na presença ou não da aloimunização, apresentando os pacientes aloimunizados uma média de 16,5 transfusões enquanto os pacientes não aloimunizados tiveram em média 7,9 transfusões.

A aloimunização esteve relacionada com a maior média de idade e com a maior frequência de uso de hidroxycarbamida. A TN não se mostrou protetora para a aloimunização ( $p=0,08$ ) e não houve diferença significativa entre os sexos dos pacientes.

Tabela 3 – Comparação entre as variáveis laboratoriais e clínicas e a aloimunização.

	Aloimunização (sim) Média	Aloimunização (não) Média	<i>p</i> *
Hemoglobina (g/dl)	8,2	8,1	0,68
VCM (fL)	96,3	92,7	<b>0,036</b>
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	12,069	12,557	0,53
Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	881	1,059	0,52
Reticulócitos (%)	8,1	8,3	0,69
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	524594	404,996	0,8
LDH (U/L)	957	848	0,05
BI (mg/dl)	2,7	2,4	0,77
Ferritina (ng/mL)	976	795	0,3
Interação/ano	0,85	0,73	0,49
Nº de transfusões	16,5	7,9	<b>0,0005</b>

VCM: volume corpuscular médio; LDH: desidrogenase láctica; BI: bilirrubina indireta

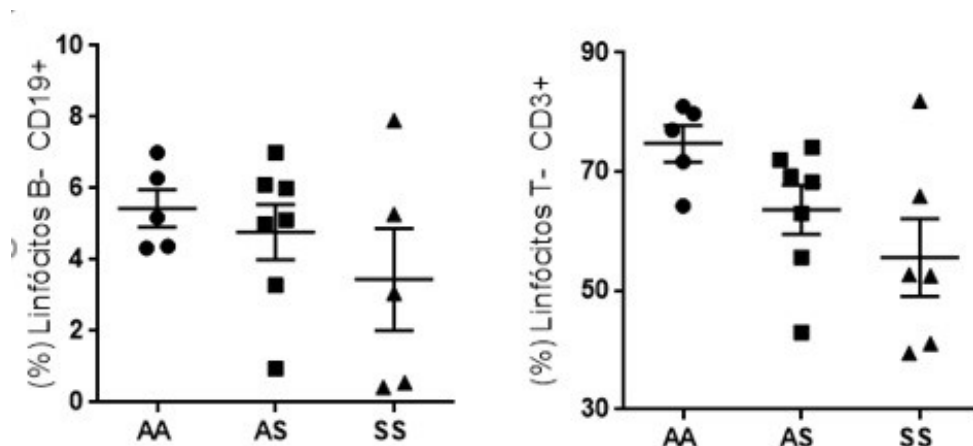
\* teste t

## 5.2 Parte 2

Foram coletadas amostras de 20 indivíduos, dos quais 6 eram portadores de AF (grupo SS), 8 de TF (grupo AS) e 6 indivíduos não possuíam nenhuma hemoglobinopatia (grupo AA); 12 (60%) eram do sexo feminino. A média de idade dos indivíduos foi de 30,8 anos (20-9±5,43).

Não se observou diferença entre as porcentagens de linfócitos B e linfócitos T entre os grupos. A figura 9 contém a distribuição dos linfócitos B (AA=5,4%±1,1; AS=4,7%±2,0; SS=3,4%±3,1) e linfócitos T (AA=74,7%±6,85; AS=63,6%±10,9; SS=55,6%±16,0).

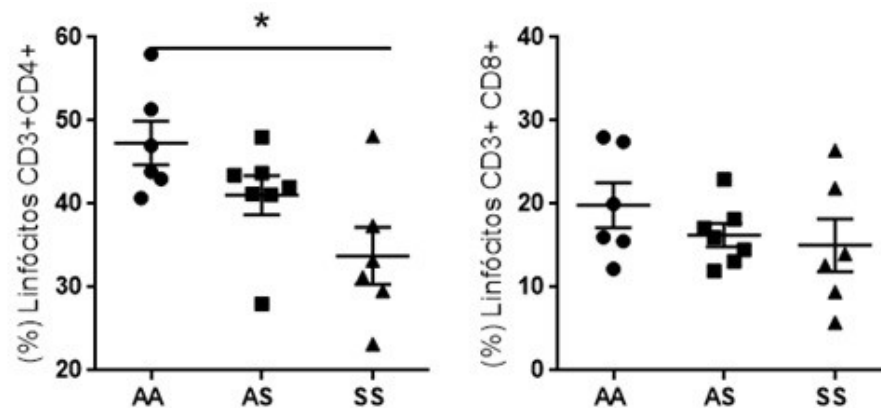
Figura 9 – Porcentagens de linfócitos B e T CD3+ nos grupos AA, AS e SS.



AA: sem hemoglobinopatia, AS: traço falciforme, SS= anemia falciforme.

As subpopulações dos linfócitos T são T CD4+ e T CD8+. Na amostra houve porcentagem menor de linfócitos T CD4+ entre os pacientes com AF, se comparados com os AA, contudo sem diferenças nas demais associações entre os grupos (AA=47,3%  $\pm$  6,3; AS=41,0%  $\pm$  6,2; SS=33,7%  $\pm$  8,4). Não foi encontrada diferença entre os grupos com relação às porcentagens de linfócitos T CD8+ (Fig. 10).

Figura 10 – Porcentagens de linfócitos T (CD4+/ CD8+) nos grupos AA, AS e SS.

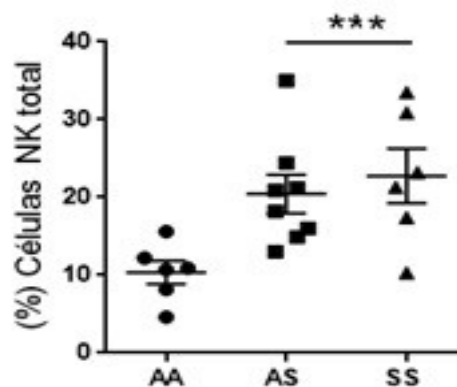


AA: sem hemoglobinopatia, AS: traço falciforme, SS= anemia falciforme.

\* Diferença entre % de linfócitos T CD4 entre grupo AA e SS, com  $p=0,041$ .

O percentual de NK foi pelo menos duas vezes maior nos pacientes com HbS (AS e SS) quando comparados com o grupo sem HbS (AA=10,3% $\pm$ 3,7; AS=20,4% $\pm$ 6,9; SS=22,1% $\pm$ 9,7). Não foi encontrada diferença entre os grupos SS e AS (Fig. 11).

Figura 11 – Porcentagens de linfócitos NK nos grupos AA, AS e SS.



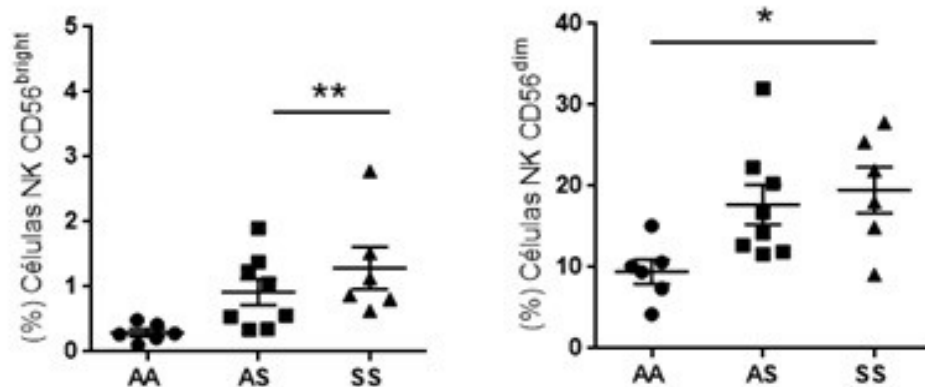
AA: sem hemoglobinopatia, AS: traço falciforme, SS= anemia falciforme.

\*\*\* Diferença entre % de células NK total nos grupos AA e SS:  $p=0,021$ , AA e AS:  $p=0,033$



Entre os subtipos de linfócitos NK foram analisadas as distribuições percentuais dos CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>. Portadores de HbS (AA e AS) apresentaram percentual pelo menos três vezes maior de NK imaturos, quando comparados com o grupo AA (AA=0,29%±0,13; AS=0,92%±0,56; SS=1,29%±0,79). Em relação às NK maduras foi encontrada diferença entre os grupos AF e AA (AA=9,4%±3,6; AS=17,7%±6,9; SS=19,5%±6,9), conforme está apresentado na Fig. 12.

Figura 12 – Porcentagem de células NK CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> nos grupos AA, AS e SS.



AA: sem hemoglobinopatia, AS: traço falciforme, SS= anemia falciforme.

\*\* Diferença entre as células NK CD56<sup>bright</sup> entre grupo AA e SS:  $p=0,0054$ , AA e AS:  $p=0,042$ .

\* Diferença entre as células NK CD56<sup>dim</sup> entre grupo AA e SS com  $p=0,038$

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Parte 1

O presente estudo avaliou o número de transfusões, perfil imunohematotógico e sua relação com a evolução clínica dos pacientes com AF. A amostra estudada foi composta por pacientes jovens, com média de idade (13,9 anos) menor que em outros estudos. (PEREIRA et al., 2008). O serviço recebe desde 2011 todos os pacientes nascidos em Sergipe com diagnóstico de AF pela TN realizada no Sistema Único de Saúde. Os lactentes, uma vez diagnosticados, têm seu acompanhamento iniciado já nos primeiros meses de vida. O serviço realiza busca ativa dos pacientes com diagnóstico de hemoglobinopatias.

Mais da metade dos pacientes deste estudo foram submetidos a transfusão sanguínea, com uma média de 6,2 transfusões por ano, entre os anos de 2012-2016, com cerca de 4% de pacientes mantidos em esquema de transfusão crônica. Transfusões recorrentes podem aumentar os riscos complicações, entre as quais a aloimunização eritrocitária (HELMAN; CANÇADO; OLIVATTO, 2011).

A aloimunização é a complicação mais frequente das transfusões de hemácias na AF e responsável por reações hemolíticas agudas e tardias, sendo a mais temida delas a reação transfusional hemolítica tardia. (YAZDANBAKHS; WARE; NOIZATPIRENNE, 2012). Além disso, a presença de aloanticorpos está associada à produção de autoanticorpos, maior prevalência de dor crônica e redução na sobrevida nos pacientes com AF. (TELEN et al., 2015; NICKEL et al., 2016).

A frequência de pacientes aloimunizados encontrada foi de 18,7%. As frequências de aloimunização nos diversos estudos variaram entre 7-52%. (TELEN et al., 2015; NICKEL et al., 2015; HELMAN; CANÇADO; OLIVATTO, 2011; LASALLE-WILLIAMS et al., 2011; ZANETTE et al., 2010; SALAH et al., 2014; PINTO; BRAGA; SANTOS, 2011; ALLALI et al., 2017; MILLER et al., 2012; MELO et al., 2018). Não foi possível identificar os anticorpos em 24% amostras. Dentre os que foram identificados obteve-se 11 diferentes tipos de aloanticorpos. A impossibilidade de se identificar esses aloanticorpos provavelmente se deve às limitações inerentes ao método de pesquisa dos anticorpos que foi utilizado, não estando disponíveis as técnicas adicionais de aloadsorção e autoadsorção.

Excluindo-se casos de anticorpos não identificados, o achado do estudo demonstra a grande imunogenicidade do sistema Rh/Kell com grande número de pacientes com anti-E, anti-e e anti-Kell, em concordância com alguns estudos publicados. (HELMAN; CANÇADO;

OLIVATTO, 2011; NICKEL et al., 2015; ZANETTE et al., 2010). Foram encontrados também anticorpos de outros sistemas sanguíneos (Fya, Jka, M) demonstrando a importância da fenotipagem pré transfusional estendida para pacientes falciformes e politransfundidos. (ALLALI et al., 2017).

Ao realizar-se a fenotipagem eritrocitária dos pacientes foi observado que os pacientes são negativos para antígenos com alta imunogenicidade. Em 45,6% dos pacientes o resultado foi negativo para o antígeno “C”, 68,1% foram negativos para o antígeno “E” e 95,9% para antígeno “kell”. Os dados das fenotipagens dos doadores, para efeito de comparação, não estavam disponíveis.

Foram identificados cinco pacientes com anti-e positivo e na amostra existem apenas seis pacientes com antígeno “e” negativo. Essa alta taxa de aloimunização (83%) entre esses pacientes é explicada pela grande prevalência de indivíduos “e” positivo na população geral e consequentemente entre os doadores de sangue. Ressalta-se a importância da realização de fenotipagem eritrocitária pré-transfusional, principalmente para pacientes negativos para antígenos de alta frequência. (LASALLE WILLIAMS et al., 2011).

Em relação à associação entre idade e aloimunização, foi encontrada relação direta entre maior média de idade e maior frequência de aloanticorpos ( $p = 0,026$ ), associação já reportada anteriormente. (NICKEL et al., 2015). A presença de aloanticorpos não esteve associada ao sexo ( $p = 0,41$ ) em concordância com outros estudos, (TELEN et al., 2015; NICKEL et al., 2015; MILLER et al., 2012) exceto o de Zanette et al. (2010), que encontrou relação entre o sexo feminino e a aloimunização ( $p=0,033$ ). (ZANETTE et al., 2010).

O uso de hidroxycarbamida esteve relacionado com maior frequência de aloimunização, o que se refere à maior gravidade dos pacientes que usam a medicação e que também necessitam de hemotransfusões. A presença de autoanticorpos esteve diretamente associada à aloimunização eritrocitária ( $p = 0,000006$ ) em consonância com os estudos anteriores. (TELEN et al., 2015; NICKEL et al., 2015). Essa relação pode ser explicada pela influência do *status* inflamatório na fisiopatologia dos anticorpos. (AZAR; WONG, 2017). A taxa de autoanticorpos encontrada pode ter dificultado a identificação dos aloanticorpos através das técnicas convencionais.

Transfusões representam múltiplas exposições a diferentes antígenos eritrocitários e, por si só, tem a capacidade de aumentar o risco de aloimunização. Isso ficou evidenciado pela média de 16,1 transfusões entre os aloimunizados e 7,0 entre os não aloimunizados ( $p < 0,001$ ). A maioria dos estudos relacionam a maior quantidade de transfusões com a aloiminização. (TELEN et al., 2015; PINTO; BRAGA; SANTOS, 2011; ALLALI et al.,

2017). Contrariamente, Sakhalkar et al. (2005) identificaram aloanticorpos em 21 pacientes após a primeira hemotransfusão. (SAKHALKAR et al., 2005). Não houve diferença no número de internações por ano entre os pacientes ( $p=0,49$ ), o que concorda com os resultados do estudo de Telen et al. (2015). (TELEN et al., 2015).

No presente estudo, a média de VCM foi maior nos pacientes que apresentaram anticorpos eritrocitários ( $p = 0,026$ ), não havendo diferença nos demais exames laboratoriais. Os pacientes aloimunizados utilizaram mais frequentemente a hidroxycarbamida, o que pode justificar o aumento do VCM. Estudos anteriores encontraram menor média de hemoglobina e maior concentração sérica de ferritina entre os aloimunizados. (TELEN et al., 2015; ZANETTE et al., 2010).

A TN não se mostrou protetora para aloimunização ( $p = 0,08$ ). Todos os pacientes do estudo realizaram transfusão no mesmo serviço de hemoterapia vinculado ao Sistema Único de Saúde. São, portanto, igualmente submetidos às consequências de eventuais irregularidades na disponibilidade de reagentes para realização de fenotipagem. Esses resultados permitem inferir que o diagnóstico por TN não protege contra a aloimunização quando não é realizada a fenotipagem estendida dos pacientes e dos hemocomponentes transfundidos em todas as transfusões, desde a primeira.

Devido às complicações inerentes à aloimunização eritrocitária, que levam a reações transfusionais e à consequente dificuldade de se conseguir concentrados de hemácias compatíveis, é essencial que sejam tomadas medidas para prevenir a aloimunização. Para os já aloimunizados, é essencial certificar-se de que não sejam administrados concentrados de hemácias com fenótipo incompatível e respeitar todos os aloanticorpos identificados. (YAZDANBAKHS; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012; NOIZAT-PIRENNE, 2012; NOIZAT-PIRENNE, 2013; VICHINSKY, 2012b).

A imunofenotipagem estendida dos doadores, associada a pesquisa de anticorpos irregulares dos pacientes com AF, é utilizada como método de prevenção da aloimunização e de redução do risco das reações transfusionais. (VICHINSKY, 2012b). Noizat-Pirenne sugere que se estimule a doação entre pessoas da mesma etnia objetivando encontrar um perfil antigênico mais próximo entre eles. Entretanto, essa conduta pode não ser efetiva no Brasil por ser um país muito miscigenado. O mesmo autor sugere também que se faça uma nova pesquisa de aloanticorpos após cada nova hemotransfusão, com um intervalo de 2-4 semanas entre a transfusão. (NOIZAT-PIRENNE, 2012; NOIZAT-PIRENNE, 2013).

## 6.2 Parte 2

O entendimento completo da fisiopatologia da AF é um desafio desde sua descrição em 1910. A hemólise e a vasoclusão decorrente da polimerização da HbS não explicam a variabilidade clínica da doença. (ZAGO; PINTO, 2007). Atualmente, a associação com processo inflamatório, com liberação de *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), lesão isquemia-reperfusão, lesão endotelial e ativação de células NKT, podem ajudar a explicar uma doença de amplo espectro clínico e com risco de múltiplas disfunções orgânicas. (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018). Estudos anteriores evidenciaram que os pacientes com AF apresentam leucocitose mesmo na ausência de evento infeccioso. (DAHMANI et al., 2016; ELALFY et al., 2018). Em crianças com AF a contagem de leucócitos é fator de risco para ocorrência de complicações agudas tais como acidente vascular encefálico, síndrome torácica aguda e crises álgicas de repetição. (QUINN et al., 2007). Além disso, leucocitose foi relacionada a redução da capacidade vital pulmonar em pacientes com AF. (DAHMANI et al., 2016).

Apesar de o papel da leucocitose estar bem relacionado com a gravidade, a função específica dos linfócitos na fisiopatologia na AF não está claramente definida. A distribuição dos linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ é diferente em diversos estudos. Inicialmente foi observado maior número de linfócitos T CD3+ e CD8+ em pacientes com AF, sem diferença nos valores de CD4+. (KOFFI et al., 2003). No estudo realizado por Musa *et al.* em 2010 não se evidenciou diferença na contagem de linfócitos CD3+ e CD8+, porém, observou-se valor menor de linfócitos CD4. (MUSA et al., 2010). ElAlfy et al. (2018) encontrou valores maiores de linfócitos T e CD4+ nos pacientes com doença falciforme, contudo, a amostra do estudo tinha pacientes com AF (com e sem uso de hidroxycarbamida) e heterozigotos com beta-talassemia. (ELALFY et al., 2018). No presente estudo os pacientes com AF apresentaram valores menores de linfócitos CD4+ quando comparados com indivíduos saudáveis. A asplenia funcional pode estar relacionada com a redução desses linfócitos. (KOFFI et al., 2003).

Os linfócitos T atuam na resposta imune específica, regulando-a através de produção de citocinas e promovendo dois tipos de resposta imune: TH1 e TH2. Alguns autores defendem que o desequilíbrio entre a resposta TH1 x TH2 poderiam justificar as diferenças de resposta e evolução clínica na AF. (ONYEMELUKWE; MUSA, 2003).

Talvez a relação de leucocitose e gravidade da doença possa estar relacionada com a

ativação de outros subtipos de leucócitos, como monócitos, neutrófilos ou células NK, durante a resposta inflamatória.

A porcentagem de linfócitos B não está alterada na AF, contudo alterações na imunidade humoral desses pacientes já foram relatadas e podem estar associadas às modificações sofridas pelo baço ao longo do tempo. (RAUTONEN et al., 1992; BALANDYA et al., 2016). O presente estudo não encontrou diferença na porcentagem de linfócitos B entre os grupos com HbS e o sem hemoglobinopatia, porém exames para avaliação da imunidade humoral e função dos linfócitos B não foram realizados.

Os pacientes com AF apresentam valores maiores de células NK quando comparados com pessoas sem hemoglobinopatias. (ELALFY et al., 2018). Um estudo anterior observou redução dos valores dos linfócitos NK ao se utilizar hidroxycarbamida e/ou transfusão crônica de hemácias, que são terapias modificadoras da história natural da AF. (ABRAHAM et al., 2019). Neste estudo foi encontrado valor maior dos linfócitos NK nos grupos AF e TF.

Esse dado enfatiza que a alteração no processo inflamatório pode existir mesmo nos pacientes assintomáticos portadores de TF. Na literatura os valores de NK na AF estão diretamente relacionados com a porcentagem de HbS (ELALFY *et al*, 2018), contudo portadores de TF não haviam sido anteriormente estudados.

Células NK não-T são divididas em CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, que possuem diferença na expressão de perforina, na capacidade citotóxica e no modo de ativação. As células CD56<sup>bright</sup> são consideradas imaturas por apresentarem baixa capacidade citotóxica e maior produção de citocinas. Em oposição, as células CD56<sup>dim</sup> tem grande capacidade citotóxica com menor produção de citocinas. (COOPER et al., 2001). No presente estudo foram encontrados valores maiores de CD56<sup>bright</sup> em pacientes portadores de HbS quando comparados com pessoas sem hemoglobinopatias, demonstrando a possível participação dessas células na fisiopatologia da AF. O CD56<sup>dim</sup> foi maior apenas nos pacientes homozigotos (SS), corroborando um estudo que encontrou valores maiores dessas células em pacientes com AF que não usavam hidroxycarbamida. (ABRAHAM et al., 2019).

Os resultados apresentados neste estudo apontam para a participação de linfócitos T e células NK na fisiopatologia da AF e sugerem, de forma pioneira, que alterações no estado inflamatório ocorram em pacientes assintomáticos portadores de TF. A influência da HbS na inflamação pode explicar as complicações já descritas nos pacientes heterozigotos e poderá contribuir para identificação de novos alvos terapêuticos ou marcadores de prognósticos.

## 7 CONCLUSÃO

A proporção de pacientes aloimunizados encontrada foi de 18,7% e os aloanticorpos mais frequentes foram os do sistema Rh/Kell. Os pacientes com AF foram negativos para antígenos de alta imunogenicidade. A aloimunização foi relacionada com a maior média de idade, maior frequência de uso de hidroxycarbamida e maior taxa de autoanticorpos. A TN não se mostrou protetora para a aloimunização.

Pacientes com AF e indivíduos assintomáticos com TF apresentaram valores maiores de células NK total e NK CD56<sup>bright</sup> em relação a indivíduos sem hemoglobinopatias. Esse achado sugere semelhanças biológicas em relação ao perfil de resposta inflamatória entre indivíduos AF e TF.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As transfusões de concentrado de hemácias ainda permanecerão por muito tempo sendo uma importante alternativa terapêutica para os pacientes com AF. Esses devem ser submetidos a fenotipagem eritrocitária expandida desde a primeira transfusão.

A fisiopatologia da AF, com a participação da inflamação crônica, pode contribuir para a gênese dos anticorpos eritrocitários. Mais estudos para avaliar a influência da aloimunização na gravidade da AF devem ser realizados.

Na inflamação crônica do paciente com AF pode ter a participação de linfócitos T e células NK na fisiopatologia. E o estado inflamatório já pode ocorrer em portadores de TF.

Se pacientes com TF já apresentam inflamação, deve-se avaliar se eles são elegíveis para serem doadores de medula óssea em transplantes alogênicos aparentados.



## 9 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A.; JACOBSON, D. A.; BOLLARD, C. M. Cellular therapy for sickle cell disease. **Cytotherapy**, v. 18, p. 1360 – 1369, 7 2016.

ABRAHAM, A. A. et al. Characterization of natural killer cells expressing markers associated with maturity and cytotoxicity in children and young adults with sickle cell disease. **Pediatric blood & cancer**, v. 66, p. e27601 –, 1 2019.

AGRAWAL, R. K. et al. Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion**, Springer India, v. 30, n. 2, p. 91 – 96, 6 2014. ISSN 0971-4502. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022916/>.

ALLADAGBIN, D. J. et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. **PloS one**, v. 13, p. e0209036 –, 12 2018.

ALLALI, S. et al. Prevalence and risk factors for red blood cell alloimmunization in 175 children with sickle cell disease in a French university hospital reference centre. **British journal of haematology**, v. 177, p. 641 – 647, 4 2017.

AYGUN, B. et al. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. **Transfusion**, v. 42, p. 37 – 43, 3 2002.

AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **The Medical clinics of North America**, v. 101, p. 375 – 393, 2 2017.

BALANDYA, E. et al. Alteration of lymphocyte phenotype and function in sickle cell anemia: Implications for vaccine responses. **American journal of hematology**, v. 91, p. 938 – 46, 5 2016.

BISPO, I. M. G. P.; IVO, M. L. **Avaliação dos parâmetros hematológicos e incidência de episódios decorrentes de vaso oclusão na pessoa com anemia falciforme, antes e depois do tratamento com hidroxiureia**. 2013. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://repositorio.cbc.ufms.br:8080/jspui/handle123456789/1750>.

BRAGA, J. A. P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. **Revista de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 233 – 238, Maio 2007/15. ISSN 1516-8484.

BRAGA, J. A. P. et al. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular: Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 38, n. 2, p. 147 – 157, 06 2016.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **The New England journal of medicine**, v. 337, p. 762 – 9, 9 1997.

Zúñiga C. P, Martínez G. C, González R. L

ZÚÑIGA, C. P.; MARTÍNEZ, G. C.; GONZÁLEZ R.L. et al. Sick cell disease: A diagnosis to keep in mind. **Revista chilena de pediatria**, v. 89, p. 525 – 529, 12 2018.

CANÇADO, R. D. et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 31, n. 5, p. 361 – 366, 00 2009.

CASTRO, O. et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 84, p. 643 – 9, 7 1994.

CAVALCANTI, J. M.; MAIO, M. C. Entre negros e miscigenados: a anemia e o traço falciforme no Brasil nas décadas de 1930 e 1940. **História, Ciências, SaúdeManguinhos**, Casa de Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, v. 18, n. 2, p. 377 – 406, 06 2011.

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nature reviews. Immunology**, v. 1, p. 41 – 9, 3 2002.

CHOU, S. T. Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act. **Hematology American Society of Hematology. Education Program**, v. 2013, p. 439 – 46, 12 2013.

CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 30, p. 591 – 608, 4 2016.

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood**, v. 97, p. 3146 – 51, 5 2001.

DAHMANI, F. et al. Etude de l'hémogramme dans la drépanocytose homozygote: à propos de 87 patients. **Pan Afr Med J**, v. 25, p. 240 –, Dex 2016.

DAILEY, H. A.; MEISSNER, P. N. Erythroid heme biosynthesis and its disorders. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, p. a011676 –, 3 2013.

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. E4110 – 8, 9 2014.

DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 115 –, 6 2014.

ELALFY, M. S. et al. Immunological role of CD4. **Immunologic research**, v. 66, p. 480 – 490, 6 2018.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 32, n. 3, p. 203 – 208, 00 2010.

FERNANDES, A. P. P.; AVENDANHA, F. A.; VIANA, M. B. Hospitalizations of children with sickle cell disease in the Brazilian Unified Health System in the state of Minas Gerais. **Jornal de Pediatria**, Sociedade Brasileira de Pediatria, v. 93, n. 3, p. 287 – 293, 06 2017.

FERNANDES, Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. **Life sciences**, v. 178, p. 100 – 108, 4 2017.

FERRAZ, M. H. C.; MURAO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 29, n. 3, p. 218 – 222, 09 2007.

FERRONE, F. A. Targeting HbS Polymerization. **Seminars in hematology**, v. 55, p. 53 – 59, 1 2019.

FLEURY, M. K. Determinação dos haplótipos do gene da globina beta em pacientes com anemia falciforme do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, scielo, v. 23, p. 57 – 58, 04 2001.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, p. a011684 –, 2 2013.

GALIZA NETO, G. C. de; PITOMBEIRA, M. da S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Sociedade Brasileira de Patologia Sociedade Brasileira de Citopatologia, v. 39, n. 1, p. 51 – 56, 00 2003.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Goldman Cecil Medicina Interna**. 24. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. v. 2.

GUTERRES, I. J. L. Novas Perspectivas No Tratamento Da Anemia Falciforme Com A Hidroxiuréia. VITTALLE, Rio Grande, 17(1): 51-58, 2005. **VITTALLE**, Rio Grande, v. 17, n. 1, p. 51 – 58, 2005.

HARBI, M. A. et al. Association between Sickle Cell Trait and the Prevalence and Severity of Diabetic Retinopathy. **PLoS One**, v. 11, n. 7, Jul 2016.

HELMAN, R.; CANÇADO, R. D.; OLIVATTO, C. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes com doença falciforme: experiência de um centro em São Paulo. **Einstein**, São Paulo, v. 9, p. 160 – 164, 2011.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, Yale Journal of Biology and Medicine, v. 74, n. 3, p. 179 – 184, May-Jun 2001.

INGRAM, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature**, v. 178, p. 792 – 4, 10 1956.

KARK, J. A. et al. Sickie-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. **The New England journal of medicine**, v. 317, p. 781 – 7, 9 1987.

KOFFI, K. G. et al. Reduced levels of T-cell subsets CD4+ and CD8+ in homozygous sickle cell anaemia patients with splenic defects. **The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association**, v. 4, p. 363 – 5, 9 2003.

LASALLE-WILLIAMS, M. et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusions

in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center (CME). **Transfusion**, v. 51, n. 8, p. 1732 – 1739, Aug 2011.

LIONNET, F. et al. Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. **Haematologica**, v. 97, p. 1136 – 41, 2 2012.

LOBO, C. L. de C. et al. Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 33, n. 1, p. 43 – 48, 02 2011.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, scielo, v. 39, p. 943 – 949, 12 2005.

MARTINS, M. M. F.; TEIXEIRA, M. C. P. Análise dos gastos das internações hospitalares por anemia falciforme no estado da Bahia. **Cadernos Saúde Coletiva**, Instituto de Estudos em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 24 – 30, 03 2017.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MCGANN, P. T. Sickle Cell Anemia: An Underappreciated and Unaddressed Contributor to Global Childhood Mortality. **the journal of pediatrics**, v. 165, n. 1, p. 18 – 22, July 2014.

MCGANN, P. T.; NERO, A. C.; WARE, R. E. Clinical Features of  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Disease. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1013, p. 1 – 26, 11 2017.

MEASE, A. D.; LONGO, D. L.; HAKAMI, N. Sicklemia and unexpected death in sickle cell trait: observations of five cases. **Mil Med**, v. 141, p. 470 – 473, 1976.

MELO, W. E. da S. et al. Aloimunização eritrocitária em pacientes com anemia falciforme atendidos no hemocentro de Caruaru, Pernambuco, Brasil. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 1, Abril 2018.

MENDONÇA, R.; SILVEIRA, A. A. A.; CONRAN, N. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 65, p. 665 – 78, 6 2016.

MILLER, S. T. et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: prevalence in 2010. **Transfusion**, v. 53, p. 704 – 9, 7 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme**: Relatório de Recomendações 2016. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme**: Portaria conjunta nº 05, de 19 de fevereiro de 2018. Brasília: [s.n.], 2018.

MITCHELL, B. L. Sickle cell trait and sudden death. **Sports Med Open**, v. 4, n. 10, Dec 2018.

MORAES, K. C. M.; GALIOTI, J. B. A doença falciforme: um estudo genéticopopulacional a partir de doadores de sangue em São José dos Campos, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, scielo, v. 32, p. 286 – 290, 00 2010.

MUSA, B. O. P. et al. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 17, p. 602 – 8, 2 2010.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. Tratamento da Doença Falciforme. In: NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. (ed.). **Doença das Células Falciformes**. [S.l.]: Sarvier, 2004. cap. 11.

NICKEL, R. S. et al. Impact of red blood cell alloimmunization on sickle cell disease mortality: a case series. **Am J Hematol**. v. 56, n. 1, p. 107 – 114, Jan 2016.

NICKEL, R. S. et al. Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. **Am J Hematol**, v. 90, n. 12, p. 1135 – 1141, Dec 2015.

NOIZAT-PIRENNE, F. Relevance of alloimmunization in haemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. **Transfusion clinique et biologique**, v. 19, n. 3, p. 132 – 138, Jun 2012.

NOIZAT-PIRENNE, F. Relevance of blood groups in transfusion of sickle cell disease patients. **Comptes rendus biologies**, v. 336, p. 152 – 8, 5 2013.

NUZZO, D. V. P. D.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, Sociedade Brasileira de Pediatria, v. 80, n. 5, p. 347 – 354, 00 2004.

ONDEI, L. S.; ZAMARO, P. j a; BONINI-DOMINGOS, C. R. A importância do diagnóstico laboratorial clássico na identificação de variantes de hemoglobinas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 27, n. 1, p. 72 – 74, 2005.

ONYEMELUKWE, G. C.; MUSA, B. O. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. **African journal of medicine and medical sciences**, v. 30, p. 255 – 9, 9 2003.

PAULING, L.; ITANO, H. A. Sickle cell anemia a molecular disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 110, p. 543 – 8, 11 1949.

PEREIRA, S. A. S. et al. Doença falciforme e qualidade de vida: um estudo da percepção subjetiva dos pacientes da Fundação Hemominas, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, scielo, v. 30, p. 411 – 416, 10 2008.

PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature communications**, v. 1, p. 104 –, 11 2010.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **The New England journal of medicine**, v. 376, p. 1561 – 1573, 4 2017.

PINTO, P. C. A.; BRAGA, J. A. P.; SANTOS, A. M. N. dos. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. **Revista da Associação Médica Brasileira**, scielo, v. 57, p. 668 – 673, 12 2011.

PLATT, O. S. Sick cell anemia as an inflammatory disease. **J Clin Invest**, v. 106, n. 3, p. 337 – 338, Aug 2000.

QUATTRONE, R. D. et al. Exercise collapse associated with sickle cell trait (ECAST): case report and literature review. **Curr Sports Med Rep**, v. 14, n. 2, p. 110 – 116, Mar-Apr 2015.

QUINN, C. T. et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas Newborn Cohort. **Blood**, v. 111, p. 544 – 8, 10 2007.

RAUTONEN, N. et al. Low number of antibody producing cells in patients with sickle cell anemia. **Immunology letters**, v. 34, p. 207 – 11, 12 1992.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sick-cell disease. **Lancet (London, England)**, v. 376, p. 2018 – 31, 12 2010.

ROBBINS. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. sexta. Rio de Janeiro - Guanabara: [s.n.], 2001.

ROBERTS, D. O. et al. Directed blood donor program decreases donor exposure for children with sickle cell disease requiring chronic transfusion. **Immunohematology**, v. 28, p. 7 – 12, 6 2012.

ROMERO, W. E. R.; RENAULD, G. F. S.; VILLALOBOS, M. A. C. Haplotipos de la hemoglobina S: importância epidemiológica, antropológica y clínica. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 3, n. 1, Jan 1988.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme: objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 29, n. 3, p. 203 – 204, 09 2007.

SAKHALKAR, V. S. et al. Allosensitization in patients receiving multiple blood transfusions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1054, p. 495 – 9, 12 2005.

SALAH, N. B. et al. Anti-erythrocyte and anti-HLA immunization in hemoglobinopathies. **Transfusion clinique et biologique**, v. 21, n. 6, p. 314 – 319, Dec 2014.

SAXENA, P. et al. Sick Cell Trait Causing Splanchnic Venous Thrombosis. **Case Reports Hepatol. (Published online 2015 Jun 29)**, Jun 2015.

SHIMAMURA, K. et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. **Cellular immunology**, v. 234, p. 31 – 8, 6 2005.

SIMÕES, B. P. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 32, n. 23, p. 46 – 53, 05 2010.

SIMÕES, B. P. et al. Allogenic bone marrow transplantation in sickle-cell diseases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Associação Médica Brasileira, v. 62, n. 22, p. 16 – 22, 10 2016.

SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 15, p. 1307 – 1316, 7 2017.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet (London, England)**, v. 364, p. 1343 – 60, 10 2004.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual review of pathology**, v. 14, p. 263 – 292, 10 2018.

TELEN, M. J. et al. Alloimmunization in sickle cell disease: changing antibody specificities and association with chronic pain and decreased survival. **Transfusion**, v. 55, n. 6 0 2, p. 1378 – 1387, 6 2015.

THOM, C. S. et al. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, p. a011858 –, 2 2013.

THORNBURG, C. D.; CALATRONI, A.; PANEPINTO, J. A. Differences in health related quality of life in children with sickle cell disease receiving hydroxyurea. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 33, n. 4, p. 251 – 254, 5 2011.

VICHINSKY, E. P. The prevention and management of alloimmunization in sickle cell disease: the benefit of extended phenotypic matching of red blood cells. **Immunohematology**, v. 28, p. 20 – 3, 6 2012a.

VICHINSKY, E. P. The prevention and management of alloimmunization in sickle cell disease: the benefit of extended phenotypic matching of red blood cells. **Immunohematology**, v. 28, p. 20 – 3, 6 2012b.

VIVAS, W. L. P. et al. Heterozigose para hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 28, n. 4, p. 284 – 287, 12 2006.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, p. 503 – 510, Apr 2008.

WAGENER, F. A. D. T. G. et al. Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System in Inflammation. New York, v. 55, n. 3, p. 551–571, 2003. **Pharmacol Rev**, v. 55, p. 551 – 571, 2003.

WALLACE, K. L.; LINDEN, J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. **Blood**, v. 116, p. 5010 – 20, 8 2010.

WARE, R. E. et al. Sickle cell disease. **Lancet (London, England)**, v. 390, p. 311 – 323, 2 2017.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, p. 704 – 12, 9 2001.

YAZDANBAKHSI, K.; WARE, R. E.; NOIZAT-PIRENNE, F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion

management. **Blood**, American Society of Hematology, v. 120, n. 3, p. 528 – 537, 7 2012.

YEE, M. E. M. et al. Hemoglobin A clearance in children with sickle cell anemia on chronic transfusion therapy. **Transfusion**, v. 58, p. 1363 – 1371, 4 2018.

YOKOYAMA, W. M.; KIM, S.; FRENCH, A. R. The dynamic life of natural killer cells. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 405 – 29, 3 2004.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. 1. ed. [S.l.]: Atheneu, 2013.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, v. 29, n. 3, p. 207 – 214, 09 2007.

ZANETTE, A. M. D. et al. Alloimmunization and clinical profile of sickle cell disease patients from Salvador-Brazil. **Ethnicity & disease**, v. 20, p. 136 – 41, 5 2010.



## **APÊNDICE A – Termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**

### **A.1 TCLE (parte 1)**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para menores de 18 anos)

Nós, pesquisadores da Universidade Federal de Sergipe, pedimos sua autorização para participação de seu filho na pesquisa: “Antígenos eritrocitários e aloimunização em uma coorte de pacientes jovens portadores de Anemia Falciforme”, a realizar-se no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário – UFS, que tem o objetivo de identificar causas e prevenir reações indesejáveis que podem ocorrer quando é necessário fazer transfusão de sangue em pacientes com anemia falciforme, como é o caso do seu (ua) filho(a).

Caso concorde com a participação, nós pediremos para responder algumas perguntas a respeito de seu filho, como: nome, idade, endereço, bem como sobre a doença.

Não existirão riscos e o único incômodo será a punção de veia para coleta de sangue que já é rotina no tratamento da doença falciforme.

Nós nos comprometemos informar os resultados dos exames e orientá-los sobre o significado dos achados, além de mantermos sigilo e confidencialidade sobre a sua participação nesse estudo.

Caso o senhor (a) não queira a participação do seu filho, saiba que isso não alterará o tratamento que vem sendo feito aqui no Ambulatório Hematologia Pediátrica, no entanto a sua participação é muito importante para nosso estudo. Contribuirá para a evolução dos conhecimentos sobre essa doença ajudando o seu filho e as outras crianças do serviço. A sua participação é voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para vocês.

Em caso de dúvida entre em contato conosco nos locais, dias e horários em que os atendimentos são realizados.

Diante do que foi dito, confirmo a participação do meu filho:

---

Assinatura do responsável

Os investigadores principais, Dra. Rosana Cipolotti e Dr. Osvaldo Alves

de M. Neto, comprometem-se a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com os termos do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

---

Pesquisador responsável

Aracaju, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para maiores de 18 anos)

Nós, pesquisadores da Universidade Federal de Sergipe, pedimos sua autorização para sua participação na pesquisa: “Antígenos eritrocitários e aloimunização em uma coorte de pacientes jovens portadores de Anemia Falciforme”, a realizar-se no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário – UFS, que tem o objetivo de identificar causas e prevenir reações indesejáveis que podem ocorrer quando é necessário fazer transfusão de sangue em pacientes com anemia falciforme, como é o seu caso.

Caso concorde com a participação, pediremos para responder algumas perguntas como: nome, idade, endereço, bem como sobre a doença.

Não existirão riscos e o único incômodo será a punção de veia para coleta de sangue que já é rotina no tratamento da doença falciforme.

Nós nos comprometemos informar os resultados dos exames e orientá-los sobre o significado dos achados, além de mantermos sigilo e confidencialidade sobre a sua participação nesse estudo.

Caso o senhor (a) não queira a participar, saiba que isso não alterará o tratamento que vem sendo feito aqui no Ambulatório Hematologia Pediátrica, no entanto, a sua participação é muito importante para nosso estudo. Contribuirá para a evolução dos conhecimentos sobre anemia falciforme. A sua participação é voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Em caso de dúvida entre em contato conosco nos locais, dias e horários em que os atendimentos são realizados.

Diante do que foi dito, confirmo a minha participação:

---

Assinatura

Os investigadores principais, Dra. Rosana Cipolotti e Dr. Osvaldo Alves de M. Neto, comprometem-se a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com os termos do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

---

Aracaju, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador responsável

## A.2 TCLE (parte 2)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, pesquisadores da Universidade Federal de Sergipe, pedimos sua autorização para sua participação na pesquisa: **“A avaliação do perfil de linfócitos T e NK em pacientes portadores de Doença Falciforme”**, a realizar-se no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário – UFS, que tem o objetivo identificar o mecanismo de lesão relacionados a crise de vaso-oclusão nos pacientes portadores de Doença, como é o seu caso.

Caso concorde com a participação, pediremos para responder algumas perguntas como: nome, idade, endereço, bem como sobre a doença.

A avaliação dos subtipos de linfócitos será realizada a partir do sangue periférico, que tem como único incômodo a punção de veia para coleta de sangue, o procedimento tem risco de formação de hematoma com dor local, este risco será minimizado a partir da realização do procedimento por profissional experiente. Caso algum evento esteja relacionado a punção, a avaliação, orientação e conduta serão dadas pelo pesquisador responsável.

Nós nos comprometemos informar os resultados dos exames e orientá-los sobre o significado dos achados, além de mantermos sigilo e confidencialidade sobre a sua participação nesse estudo.

Caso o senhor (a) não queira a participar, saiba que isso não alterará o tratamento que vem sendo feito aqui no Ambulatório Hematologia Pediátrica, no entanto, a sua participação é muito importante para nosso estudo. Isso porque estará contribuindo para a evolução dos conhecimentos sobre anemia falciforme. A sua participação é voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Em caso de dúvida entre em contato conosco nos locais, dias e horários em que os atendimentos são realizados. Dra. Priscila: 79-99807-2097. Dr. Osvaldo: 79-99971-0121. Dra. Rosana: 79-99981-1238

Diante do que foi dito, confirmo a minha participação:

---

Assinatura

Os investigadores principais, Dra. Rosana Cipolotti e Dra. Priscila Oliveira Percout, comprometem-se a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com os termos do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

Aracaju, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

APÊNDICE B – Questionário

QUESTIONÁRIO

Data coleta:

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_ Gênero: \_\_\_\_\_

**DIAGNÓSTICO:** \_\_\_\_\_ Triagem neonatal ( ) sim ( ) não

**Uso de hidroxiuréia:**

**Deferasirox**

---

AVE	Úlceras	Gestação
STA	<b>Dor crônica</b>	Filhos vivos
Priaprismo	<b>Litíase biliar:</b>	<b>Cardiopatía</b>
Disfunção sexual	Operado	Medicação
Osteonecrose	<b>Baço</b> Esplenomeg	<b>Nefropatia</b>
Retinopatía	Cirurgia	Medicação
Asma	<b>Sequestro</b>	<b>Morte</b> Causa

---

Internações/ ano:

**RESULTADOS DE EXAMES (últimos 5 exames de rotina)**

*Hb*

*VCM*

*Leucócitos*

*Monócitos*

*Plaquetas*

*Reticulócitos*

*BT*

*BI*

*Ferritina*

*Proteinúria*

*TGO*

*TGP*

*LDH*

*Microalbum*

***Ultrassonografia de crânio:***

***Fundo de olho:***

***Saturação (oximetria)***

***Espirometria:***

***Ecocardiograma:***

Transfusão                      2012                      2013                      2014                      2015                      2016

Transfusão crônica: \_\_\_\_\_                      Indicação: \_\_\_\_\_                      data: \_\_\_\_\_

**Fenotipagem eritrocitária:**

A                      B                      D                      C                      c                      E                      e                      Kell                      K                      Cw

M                      N                      S                      S                      Fya                      Fyb                      Kpa                      Kpb                      JKa                      JKb

P1                      Lea                      Leb                      Lua                      Lub                      ctl

**Pesquisa de anticorpos irregulares:**

\_\_\_\_\_

Data:

PAI

\_\_\_\_\_

**Identificação de anticorpos irregulares:**

\_\_\_\_\_

Data:

IAI

\_\_\_\_\_

**Coombs direto:**

## APÊNDICE C – Artigos

### C.1 Artigo 1 (artigo original - Revista

#### Transfusion)

Figura 13 – Submissão artigo 1

# TRANSFUSION

## IMMUNOHEMATOLOGICAL EVALUATION OF PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA AND THE INFLUENCE OF NEONATAL DIAGNOSIS ON ERYTHROCYTE ALLOIMMUNIZATION

Journal:	<i>Transfusion</i>
Manuscript ID	Trans-2019-0466
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	18-Jun-2019
Complete List of Authors:	Menezes Neto, Osvaldo Alves de Menezes; Medicina Viana, Simone; Universidade Federal de Sergipe Almeida, Bruno; Universidade Federal de Sergipe Souza, Ricardo Henrique; Universidade Federal de Sergipe Freitas, Silvio Henrique; Universidade Federal de Sergipe Cicolotti, Rosana; Universidade Federal de Sergipe, Medicina
Key words:	RBC Transfusion, Transfusion Complications- Non Infectious, Immunohematology (RBC serology, blood groups)

## C.2 Artigo 2 (Brief Reports - British Journal of Haematology)

Figura 14 – Submissão artigo 2

**Hemoglobin S and distribution of lymphocytes B, T and Natural Killer cells (NK): is the inflammatory status present in sickle cell trait?**

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID	BJH-2019-01151
Manuscript Type:	Short Reports
Date Submitted by the Author:	16-Jun-2019
Complete List of Authors:	Menezes Neto, Osvaldo; Universidade Federal de Sergipe, Medicina Percout, Priscila; Universidade Federal de Sergipe, Medicina Barreto, Aline; Universidade Federal de Sergipe, Medicina Corrêa, Cristiane; Universidade Federal de Sergipe, Medicina Ribeiro, Jordy; Universidade Federal de Sergipe, Medicina Ramos da Silva, Guilherme; Universidade Federal de Sergipe, Medicina andrade, thiago; Universidade Federal de Sergipe, Medicina Rosana, Cipolotti; Universidade Federal de Sergipe, Medicina
Key Words:	Sickle cell anemia, sickle cell trait, INFLAMMATION, LYMPHOCYTES

SCHOLARONE™  
Manuscripts